



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

DISEÑO RACIONAL DE UNA VACUNA
RECOMBINANTE CONTRA EL VIRUS DE LA FIEBRE
AFTOSA VECTORIZADA E INMUNOMODULADA POR
BACULOVIRUS

Tesista: Eugenia Tavarone

Director: Oscar Taboga

Codirector: Augusto Pich Otero

Año: 2018

ÍNDICE

<i>ABREVIATURAS.....</i>	<i>5</i>
<i>INTRODUCCIÓN GENERAL.....</i>	<i>7</i>
<i>Generación de inmunidad protectora y desarrollo racional de vacunas.....</i>	<i>7</i>
<i>Clásicos y nuevos adyuvantes.....</i>	<i>19</i>
<i>Los BV como inmunomoduladores.....</i>	<i>23</i>
<i>La fiebre aftosa y la importancia de las vacunas de nueva generación.....</i>	<i>25</i>
<i>HIPÓTESIS Y OBJETIVO GENERAL.....</i>	<i>35</i>
<i>MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES.....</i>	<i>37</i>
 <i>CAPÍTULO I: ESTUDIO DE LA DEPENDENCIA ENTRE LA LOCALIZACIÓN DEL ANTIGENO VECTORIZADO Y LA RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA GENERADA.....</i>	 <i>47</i>
<i>Introducción.....</i>	<i>47</i>
<i>Objetivos específicos.....</i>	<i>53</i>
<i>Materiales y métodos.....</i>	<i>55</i>
<i>Producción y caracterización de los baculovirus recombinantes BV-OVA.....</i>	<i>55</i>
<i>Selección del antígeno modelo.....</i>	<i>55</i>
<i>Construcción de los vectores de transferencia pFB-OVA.....</i>	<i>55</i>
<i>Caracterización de los BV-OVA por inmunomicroscopía de fluorescencia.....</i>	<i>60</i>
<i>Caracterización de los BV-OVA por Western blot.....</i>	<i>62</i>
<i>Determinación de la respuesta celular citotóxica específica para OVA.....</i>	<i>62</i>
<i>Experimentos de citotoxicidad in vivo en el modelo ratón.....</i>	<i>62</i>
<i>Cultivo y reestimulación de esplenocitos in vitro.....</i>	<i>64</i>
<i>Cuantificación de IFN-γ en sobrenadante de cultivo de esplenocitos.....</i>	<i>64</i>
<i>Determinación de la respuesta humoral en el modelo ratón.....</i>	<i>64</i>
<i>Determinación de anticuerpos totales anti OVA.....</i>	<i>65</i>

<i>Determinación de anticuerpos totales anti BV.....</i>	<i>65</i>
<i>Determinación del perfil de isotipos.....</i>	<i>66</i>
<i>Resultados.....</i>	<i>67</i>
<i>Obtención y caracterización de los BV-OVA.....</i>	<i>67</i>
<i>Evaluación de la respuesta citotóxica específica para OVA.....</i>	<i>76</i>
<i>Evaluación de la respuesta humoral.....</i>	<i>79</i>
 CAPÍTULO II: ESTUDIO DEL EFECTO DE LA FORMULACIÓN DE LOS BV-OVA CON ADYUVANTES CLÁSICOS.....	 85
<i>Introducción.....</i>	<i>85</i>
<i>Objetivos específicos.....</i>	<i>91</i>
<i>Materiales y métodos.....</i>	<i>93</i>
<i>Formulación de los BV-OVA.....</i>	<i>93</i>
<i>Determinación del efecto de la formulación sobre la respuesta humoral.....</i>	<i>93</i>
<i>Determinación del efecto de la formulación sobre la respuesta celular citotóxica.....</i>	<i>94</i>
<i>Resultados.....</i>	<i>95</i>
<i>Evaluación del efecto de la formulación sobre la respuesta humoral.....</i>	<i>95</i>
<i>Evaluación del efecto de la formulación sobre la respuesta citotóxica.....</i>	<i>96</i>
 CAPÍTULO III: ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PROTECTORA DE DIFERENTES CANDIDATOS VACUNALES PARA FMDV-A2001.....	 99
<i>Introducción.....</i>	<i>99</i>
<i>Objetivos específicos.....</i>	<i>109</i>
<i>Materiales y métodos.....</i>	<i>111</i>
<i>Producción y caracterización de BV-FMDV.....</i>	<i>111</i>
<i> Selección de los antígenos.....</i>	<i>111</i>
<i> Construcción de los vectores de transferencia.....</i>	<i>112</i>
<i> Obtención y caracterización de los BV-FMDV.....</i>	<i>117</i>
<i>Determinación de la respuesta humoral específica contra A2001.....</i>	<i>118</i>
<i>Determinación del aporte de la presencia de VP2 en la cápside a la protección</i>	<i>119</i>
<i>Experimentos de desafío con A/Arg/2001 en el modelo ratón.....</i>	<i>119</i>

<i>Resultados</i>	<i>121</i>
<i>Obtención y caracterización de los BV-FMDV.....</i>	<i>121</i>
<i>Evaluación de la respuesta protectora generada por los BV-FMDV.....</i>	<i>135</i>
<i>Evaluación de la respuesta humoral.....</i>	<i>136</i>
<i>Evaluación del aporte de la presencia de VP2 en la cápside a la protección.....</i>	<i>137</i>
<i>Evaluación del candidato vacunal.....</i>	<i>138</i>
 <i>DISCUSIÓN GENERAL.....</i>	 <i>141</i>
 <i>CONCLUSIONES.....</i>	 <i>163</i>
 <i>ANEXOS.....</i>	 <i>165</i>
 <i>BIBLIOGRAFÍA.....</i>	 <i>175</i>

ABREVIATURAS

°C: grados Celsius

aa: aminoácidos

AcMNPV: *Autographa californica* múltiple nucleopoliedrovirus

DAMP: del inglés, *Damage-Associated Molecular Pattern*

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNAC: DNA copia

RNA: ácido ribonucleico

RNAm: RNA mensajero

BEVS: del inglés, *Baculovirus Expression Vector System*

BV: baculovirus brotado

CD: células dendríticas

CPA: célula presentadora de antígeno

CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

DO: densidad óptica

dpi: días post inmunización

dpt: días post transfección

GFP: del inglés, *Green Fluorescent Protein*

h: hora

IFN: interferón

IL: interleuquina

i.m.: vía intramuscular

i.p.: vía intraperitoneal

i.v.: vía intravenosa

kDa: kilodaltons

kpb: kilopares de bases

LB: linfocito B

LT: linfocito T

min: minutos

Moi: multiplicidad de infección

OVA: ovoalbúmina

OVAp: péptido de OVA entre los aa 257 al 267 conteniendo un epitope CD8.

ORF: del inglés, *Open Reading Frame*

PAMPs: del inglés, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

pb: pares de bases

PCR: del inglés, *Polimerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa

PRRs: del inglés, *Pathogen Recognition Receptors*

rpm: revoluciones por minuto

s: segundos

SAP: del inglés, *Shrimp Alkaline Phosphatase*, fosfatasa alcalina

Sf9: Línea celular derivada de *Spodoptera frugiperda*

SFB: suero fetal bovino

TCR: del inglés, *Tcell Receptor*

TLRs: del inglés *Toll Like Receptors*

ufp: unidades formadoras de placas de lisis

UV: ultra violeta

VLP: del inglés, *Virus Like Particles*, partículas semejantes a virus

Wt: del inglés, *Wild type*, tipo salvaje

μl: microlitros

μm: micrómetros

μM: micromolar

INTRODUCCIÓN GENERAL

*HIPÓTESIS Y OBJETIVO
GENERAL*

Generación de inmunidad protectora y desarrollo racional de vacunas

El primer antecedente de desarrollo y aplicación de una vacuna vírica nos remonta al año 1000 en China, donde la viruela se había convertido en la principal enfermedad responsable de mortalidad. Mediante la inoculación del virus vivo sobre la piel de animales y humanos, es decir, por una vía diferente a la vía natural de entrada, los individuos producían reacciones predominantemente cutáneas, siendo los síntomas de la enfermedad más suaves y confiriendo protección frente a un posterior infección por la ruta natural, la vía respiratoria. Esta práctica se difundió al principio hacia África y Turquía y posteriormente a Europa y América, y fue ampliamente utilizada durante la segunda mitad del siglo XVIII.

Teniendo en cuenta el contexto histórico y el marco teórico acotado por los pocos conocimientos previos de los cuales la humanidad disponía, podemos considerar entonces que este es el primer antecedente de desarrollo racional de una vacuna.

Posteriormente, en 1796, Edward Jenner realizó el primer avance en la evolución de las vacunas: utilizando una variante del virus que afectaba al ganado bovino obtenido de lesiones cutáneas de mujeres ordeñadoras, logró conferir inmunidad contra la viruela humana. Es bien conocido el relato de su experimento inoculando material proveniente de escaras de lesiones bovinas en un niño que resultó completamente protegido frente a un posterior desafío intencional con material conteniendo el virus de la viruela, ensayo denominado en aquel entonces *variolae vaccinae* y acortado a nuestro tiempo como *vacunación*.

Sin duda, el gran salto llegó a mediados del siglo XX, impulsado por el desarrollo de métodos para multiplicar virus en cultivos celulares. Pioneros de esta técnica fueron John Enders, Frederick Robbins y Thomas Weller, y su método se trasladó rápidamente al desarrollo de vacunas. Así, durante la década de 1950 tuvo lugar la gran controversia sobre las vacunas de polio, durante la que se desarrollaron dos estrategias de concepción distintas: la inactivación viral desarrollada por Salk, quien había adquirido experiencia de su trabajo previo con influenza, y la estrategia de atenuación de Sabín y Hilary Koprowski a través de

sucesivos pasajes en cultivos celulares y ratones. En ambos casos, sin embargo, quedó demostrado que los anticuerpos eran los responsables de la capacidad de proteger individuos contra el poliovirus, conocido de antemano el poder profiláctico de las inmunoglobulinas.

En la década de 1960 se desarrollaron tres de las vacunas atenuadas clásicas, dirigidas contra el sarampión, las paperas y la rubéola, mediante el pasaje seriado en huevos embrionados o cultivos celulares. En los tres casos, de nuevo, se estableció mediante ensayos de administración pasiva que la presencia de anticuerpos neutralizantes correlacionaba con su capacidad de conferir protección, de manera que el objetivo era mantener a los virus poco reactogénicos pero inmunogénicamente similares.

Aunque la generación de vacunas inactivadas y de vacunas atenuadas constituyó un avance importante, en ambos casos las desventajas que presentaban limitaron su implementación. Para finales del siglo, la incesante búsqueda de vacunas alternativas, que aseguren una adecuada protección de la población susceptible y reduzcan los riesgos y costos que implican la producción y utilización de vacunas convencionales, fue alcanzada por la llegada de dos importantes estrategias: la conjugación de polisacáridos capsulares bacterianos a proteínas y la tecnología del DNA recombinante. Así, la primera vacuna humana desarrollada mediante la expresión de un antígeno en un sistema heterólogo utilizando ingeniería genética se dirigió contra el virus de la hepatitis B. Posteriormente, la inserción de genes que codifican las proteínas L1 del virus papiloma humano en el genoma de levaduras o de baculovirus permitieron la producción de partículas semejantes a virus (*VLP, Virus-Like Particles*). En general, las vacunas de tercera generación, tales como las vacunas a subunidades, a péptidos sintéticos y a ácidos nucleicos, poseen una composición definida, escaso riesgo de escape por manipulación de patógenos y facilitan la diferenciación de animales vacunados de infectados. Sin embargo, cada una de estas estrategias presenta desventajas particulares, como la falta de conformación nativa de los antígenos expresados en sistemas procariontes, la baja inmunogenicidad de epitopes libres, la necesidad de desarrollo de métodos de purificación, la patogenicidad potencial de los vectores vivos y la selección de variantes virales observada debido a la baja antigenicidad de las vacunas peptídicas. Esta diferencia entre el diseño teórico de un inmunógeno y los resultados

empíricos evidencia la importancia de la comprensión del funcionamiento del sistema inmune. Este sistema lucha contra agentes infecciosos como virus, bacterias y parásitos. Por lo tanto, es razonable que un inmunógeno que consiste exclusivamente en una proteína, un péptido o una molécula de DNA, libre de la señales de peligro que forman parte de los agentes infecciosos y que dan el alerta a las células del sistema inmune, resulte poco eficiente para inducir inmunidad.

Cuando un patógeno ingresa al organismo, la inmunidad innata del huésped inicia el combate. Si bien los mecanismos que operan inicialmente son generales, la rápida respuesta mediada por las células involucradas no sólo permite contener la infección sino también ganar tiempo para montar los mecanismos de respuesta adaptativa. Asimismo, y debido a que son las primeras en interactuar con el patógeno, las células de la inmunidad innata decodifican las características del patógeno y orientan el perfil de respuesta adaptativa a generar. En este sentido, las células dendríticas (CD) son el grupo de células más importantes. Existen diferentes subgrupos de CD, según su localización y función más específica en el organismo. Sin embargo, en forma general, estas células son las encargadas de internalizar al patógeno en el sitio de infección y, mediante sus PRR (*Pathogen Recognition Receptors*, Receptores de Respuesta a Patógenos), iniciar el perfil de respuesta más adecuada (Fig. I1).

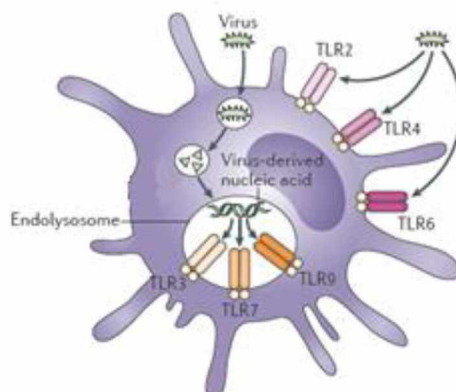


Figura I1. Activación de CPAs a través de RRP: Varias clases de receptores de reconocimiento de patrones (RRP), como los receptores *Toll-like* (TLR), detectan la presencia de patógenos virales y la activación de estos receptores conduce a la activación de células presentadoras de antígeno (CPA), entre ellas las células dendríticas (CD). Las CPAs activadas regulan positivamente su propia expresión de moléculas del MHC y de moléculas coestimuladoras, que son importantes para la activación de las células T vírgenes específicas del virus. La activación de RRP por unión a su ligando en el sitio de infección induce inflamación local, que implica la activación de varias poblaciones de células inmunes innatas que pueden controlar los títulos virales y establecer gradientes de quimioquinas para atraer más células efectoras antivirales. La eficacia de la activación de los RRP puede determinar si la replicación viral o la inmunidad protectora ganan la partida.

Endolysosome: Endolisosoma. *Virus-derived nucleic acid:* Ácido nucleico derivado del virus

Modificado de Swain (2012) [1].

Las CD activadas migran por vía aferente linfática hasta los ganglios linfáticos donde presentan epitopes lineales del antígeno previamente procesado a los linfocitos T vírgenes e inducen su activación. Una célula T virgen que se expone al antígeno para el que posee un receptor específico, se activa y prolifera, generando así un grupo de células efectoras. Asimismo, la correcta activación del clon también permite la generación de un subgrupo de células de memoria, que serán reactivadas frente a una entrada posterior del patógeno. De aquí se desprende la importancia de la correcta presentación del antígeno a estas células. Las células presentadoras profesionales internalizan al patógeno, lo procesan y presentan fragmentos cortos y lineales de todos sus antígenos en su superficie celular. La vía endógena de procesamiento permite la presentación de antígenos en el contexto del CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) de clase I a los LT CD8+. Para que esto ocurra, el antígeno debe ser sintetizado en el citoplasma celular, hecho que se da comúnmente en infecciones virales y tumores. Las CD tienen además la capacidad de internalizar antígenos del

ambiente extracelular y presentarlos como péptidos unidos a moléculas del CMH-I, hecho conocido como presentación cruzada. Los antígenos exógenos se presentan mejor en forma cruzada si se encuentran como antígenos particulados y son internalizados en macropinosomas o endosomas. Por otro lado, la vía exógena genera péptidos derivados de antígenos cargados en CMH de clase II que pueden entonces ser presentados a LTCD4+. Asimismo, mencionamos que los patógenos poseen patrones moleculares y señales de peligro (PAMPs, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*, y DAMPs, *Damage-Associated Molecular Patterns*) que impactan en los diferentes tipos de receptores que poseen las células presentadoras y disparan así la secreción de uno u otro tipo de citoquinas, lo que constituye también una señal de activación para los linfocitos, y en el caso de los LTCD4+ *naïve* (Th0), esto será fundamental también para dirigir su diferenciación. Finalmente, es necesaria una tercera señal para la activación de un LT *naïve*: la interacción de moléculas coestimulatorias expresadas en la superficie de la CD presentadora con el receptor coestimulatorio en el LT *naïve* (Fig. I2).

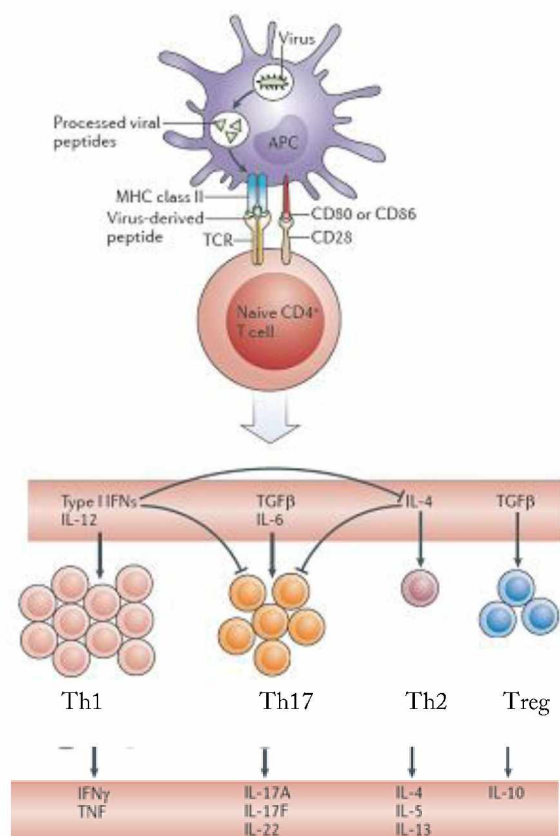
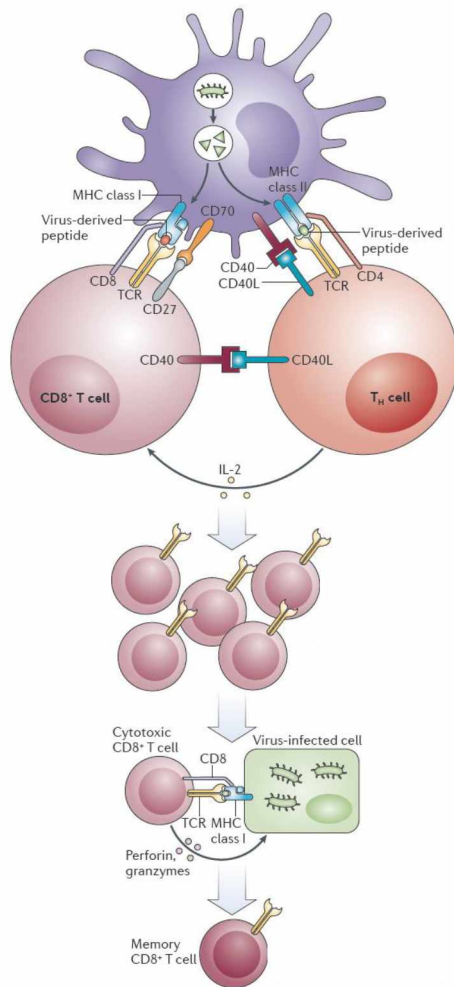


Figura I2: Generación de células T CD4+ efectoras. Los pasos iniciales cruciales incluyen la incorporación de antígenos virales por las CPAs en el tejido infectado, su activación tras el reconocimiento de un ligando apropiado por parte de su RRP y la migración de estas células al nódulo linfático. La naturaleza de la infección viral, así como la activación de los RRP, pueden influir en el estado de activación de las CPAs portadoras de antígenos y en el entorno de polarización de células Th. Tras el reconocimiento de un antígeno específico presentado por una CPA correctamente activada, las células T CD4+ vírgenes proliferan y se polarizan en distintas subpoblaciones de células T helper (Th) efectoras que orquestan diferencialmente respuestas inmunes protectoras. La diferenciación es controlada por conjuntos únicos de factores de transcripción, cuya expresión es determinada por múltiples señales pero particularmente por factores solubles que actúan sobre las células T CD4+. Aunque la producción de IFN- γ , IL-4 e IL-17 se asocia comúnmente a subpoblaciones específicas (Th1, Th2 y Th17, respectivamente), existe una considerable plasticidad en subconjuntos de células Th *in vivo*. La eliminación exitosa de patógenos virales en particular depende de respuestas complejas que abarca múltiples subconjuntos de células Th. En conjunto, estas subpoblaciones de células T son capaces de mediar funciones antivirales directas y de proporcionar ayuda a las células B y TCD8+ (véase Fig. I3). Tras la reestimulación, las células TCD4+ de memoria retienen sus funciones efectoras previas y producen rápidamente citocinas efectoras. *Processed viral peptide*: Péptido viral procesado. *MHC class II*: MHC clase II. *Virus-derived peptide*: Péptido derivado del virus. *Naïve CD4+ T cell*: LTCD4+ naïve. *Type I IFNs*: Interferones de tipo I. TGF β , factor de crecimiento transformante- β . Modificado de Swain (2012) [1].

La interacción con las CD estimula la producción de IL-2 por parte de los Th0, citoquina que actúa autócrinamente e induce su expansión clonal. Los Th0 reconocen los epitopes que la CD les presentó en el contexto de CMH-II y también responden al entorno de citoquinas generado fundamentalmente por las mismas CD, cuyos PRR fueron activados al decodificar al patógeno. De manera simplificada, estas señales dirigen su diferenciación a Th1 (por presencia de IL-12 que puede ser producida por la misma CD o por un macrófago activado) o a Th2 (por presencia de IL-4) (Fig. I2). Una vez activados, estos LTh producen también citoquinas específicas del perfil. Los LTh1 producen IFN- γ (citoquina de gran trascendencia en respuestas inflamatorias, ya que estimula la activación de macrófagos, LTCD8+ citotóxicos y el *switch* de isotipos a anticuerpos con capacidad opsonizante, IgG2a), mientras que los Th2 producen IL-4 (vinculada a la activación de LB a plasmocitos productores de IgG1) y también IL-6 e IL-10, citoquinas antiinflamatorias (Fig. I2). Una vez activados, la función efectora principal de los LTh1 es activar macrófagos y LT citotóxicos, y en el caso de los LTh2, colaborar en la respuesta B. La figura I3 representa la colaboración de los LTh en la activación de células B y TCD8+.

A



B

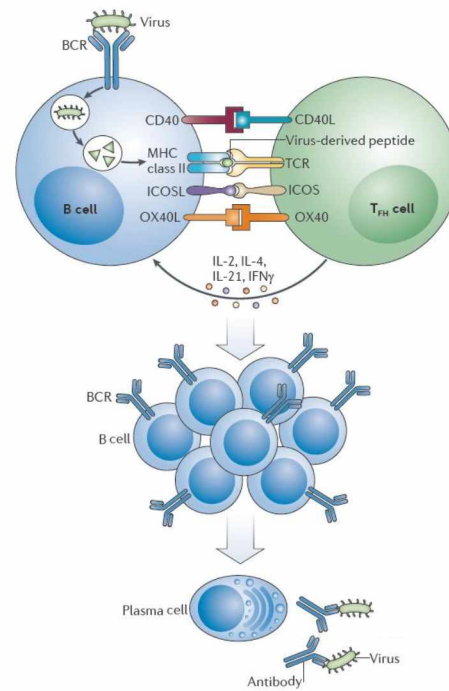


Figura I3: Funciones helper de las células TCD4+. **Panel A: Activación de LTCD8+ naïve mediante las interacciones LTh-CPA-LTCD8+.** La vía mejor caracterizada en la generación de efectores TCD8+ implica la producción y liberación de IL-2 y la activación de CPA mediante interacciones CD40L-CD40. No está completamente esclarecido si la ayuda mediada por células TCD4+ tiene un papel en la generación inicial de respuestas efectoras de células TCD8+ antivirales, pero, se ha demostrado su papel clave en la generación de células TCD8+ con memoria funcional. **Panel B: Formación del centro germinal y colaboración con LB (cambio de isotipo y maduración de la afinidad de los anticuerpos).** Las células *helper* foliculares (*T_{fh}*) son un subconjunto especializado de LTCD4+ que proporcionan ayuda a las células B a través de interacciones célula-célula (más notablemente interacciones CD40L-CD40) y mediante la liberación de citoquinas. *Virus-derived peptide*: Péptido derivado del virus. *MHC class I*: CMH clase I. *MHC class II*: CMH clase II. *Th cell*: LTh. *CD8+ T cell*: LTCD8+. *Cytotoxic CD8+ T cell*: LTCD8+ citotóxico. *Perforin, granzymes*: Perforinas y granzimas. *Virus-infected cell*: Célula infectada por el virus. *Memory CD8+ T cell*: LTCD8+ de memoria. *T_{fh} cell*: LThf. *B cell*: LB. *Plasma cell*: Célula plasmática. *Antibody*: Anticuerpo. Modificado de Swain (2012) [1].

En cuanto a los linfocitos B (LB), es importante destacar que éstos son capaces de reconocer al antígeno en su conformación nativa y no requieren la participación de células presentadoras de antígeno. Reconocen sólo epitopes conformacionales o lineales que estén expuestos en el antígeno, a través de su receptor B. Uno de los componentes de este receptor es la inmunoglobulina específica de ese clon, cuya función no es efectora, sino que es la encargada de mediar el reconocimiento específico con el antígeno. Como consecuencia del reconocimiento antigénico, se induce la agregación de moléculas del BCR lo que genera su activación. Una vez activados, los LB tienen una única función: producir anticuerpos efectores. De aquí se desprende que la respuesta B puede darse en forma T independiente.

Para la activación de la mayoría de los linfocitos B se requiere, además del reconocimiento de un determinado antígeno por el complejo BCR (primera señal), la presencia de linfocitos T que facilitan una segunda señal necesaria para una óptima activación de los mismos. Este proceso se conoce como activación B dependiente de linfocitos T. Esto se debe a que los linfocitos B *naïve*, al igual que los linfocitos T *naïve*, precisan de al menos dos señales para su activación. Como se mencionó, la primera señal está dada por la unión del antígeno a la inmunoglobulina que forma parte del receptor B. Esto desencadena la internalización del patógeno, su procesamiento y presentación por medio de la vía exógena de péptidos en CMH-II, para poder ser presentados a LTh. Es importante destacar que el epitope reconocido por la inmunoglobulina de membrana del clon B no necesariamente es el mismo que luego presenta en su superficie. De hecho, en la mayoría de los casos no lo es. Así, por ejemplo, los linfocitos B pueden interactuar con los hidratos de carbono de una proteína de superficie, pero luego, al internalizar y procesar toda la partícula, le presentarán péptidos a los linfocitos T. El requisito excluyente es que los epitopes que reconoce el BCR y el que reconoce el TCR se encuentren en la misma partícula que endocitó el LB. Entonces, la segunda señal proviene justamente de la interacción con los linfocitos T *helper* foliculares (LThf) que, a su vez, habían sido previamente activados por una CD. La interacción LThf-LB se produce mediante la presentación por parte del LB de los péptidos que cargó en el CMH-II al LThf. Esto induce la expresión en superficie de la molécula de adhesión CD40 ligando en el LT

reconocida por la molécula CD40 presente en la membrana del LB. Además, las células B expresan las moléculas de activación CD80 y CD86 que interactúan con la molécula CD28 de linfocitos T para una buena activación de los LB, y una estimulación de los LT. Finalmente, para que la proliferación y diferenciación de los LB se lleve a cabo, es necesaria la presencia de citoquinas (en particular IL-21, IL-10 e IL-4) que son secretadas por el LThf sólo si éste reconoció el complejo Ag-CMH-II del LB. Como podemos ver, nuevamente se presentan mecanismos de activación mutua.

Por otro lado, es importante mencionar la importancia del rol de otras células del sistema inmune innato en la modulación de la respuesta adaptativa. Así, las células *Natural killer* (NK) son la principal fuente de IFN- γ en el transcurso de los procesos infecciosos. Durante la infección, estas células acceden al tejido afectado, son activadas por las señales allí presentes (ligandos expresados en la superficie de las células infectadas, citoquinas producidas por macrófagos y CD, y también la activación de sus propios PRR). El IFN- γ secretado en el foco inflamatorio por las células NK activa macrófagos y promueve la maduración de las CD y la producción de IL-12 y otras citoquinas por estas células, lo que a su vez nuevamente estimula a las NK. De esta forma se establece un circuito bidireccional inflamatorio. Las NK una vez activadas migran a órganos linfáticos secundarios. Por otro lado, las CD maduras y activadas también migran a los órganos linfáticos secundarios y allí también se establece una comunicación similar con las células NK no activadas presentes en los ganglios. En presencia de las citoquinas producidas por las CD, las células NK se activan y producen IFN- γ , mediando así indirectamente el desarrollo de respuestas Th1 y respuestas mediadas por LTCD8+ citotóxicos. La interacción temprana CD-NK modula la respuesta adaptativa hacia un perfil Th1.

Además del avance en el conocimiento de la biología celular y molecular, el éxito en el diseño de vacunas requiere la comprensión de los mecanismos que operan cuando el organismo se enfrenta a un patógeno o a un inmunógeno. Entender el funcionamiento del sistema inmune y su modulación permite dirigir y potenciar las respuestas obtenidas. Históricamente, la capacidad de conferir protección de una formulación vacunal fue

asociada a la inmunidad humoral, por lo que la generación de anticuerpos ha sido el objetivo principal. Sin embargo, la inmunidad celular constituye también un pilar fundamental. Podemos mencionar las vacunas contra *M. bovis* y varicela Zoster como ejemplos claros. Asimismo, fue crítico el avance en los conocimientos sobre la respuesta innata, las diferentes funciones de los distintos tipos de anticuerpos y la función de las células TCD4+ y TCD8+ en respuesta a una inmunización. Más aún, ha sido demostrado que las células T colaboradoras son esenciales para el desarrollo de respuesta B de memoria y anticuerpos duraderos. Esto es importante ya que hoy entendemos que el éxito de una vacuna depende también de su capacidad de generar potentes y persistentes respuestas de memoria de linfocitos B y de células T, tanto CD8+ como CD4+. En los últimos años, el esfuerzo de múltiples grupos de investigación se ha centrado en estudiar los mecanismos que subyacen la respuesta inmune innata y adaptativa contra los patógenos y las vacunas. Hoy sabemos que para que una molécula sea considerada un buen inmunógeno, debe poseer tanto epitopes que puedan unirse a los anticuerpos de superficie de los linfocitos B vírgenes como también epitopes que promuevan la ya mencionada comunicación célula a célula entre los linfocitos B y las células T colaboradoras, a través de la interacción entre moléculas del CMH de clase II y el péptido anclado al receptor T. Esta interacción es sumamente importante para producir la maduración del linfocito B a célula secretora de anticuerpos o plasmocito. Más aún, los conocimientos alcanzados permitieron entender que las CD juegan un rol crítico, censando los patógenos o vacunas directa o indirectamente, mediante diferentes mecanismos que incluyen su comunicación con células del sistema inmune innato. Así, las CD son las encargadas de integrar toda la información para regular la cantidad, calidad y persistencia de la respuesta inmune adaptativa. Algunos estudios recientes muestran que tanto la respuesta humoral como la celular tienen funciones clave en la inmunidad conferida por las vacunas de hepatitis A, hepatitis B, tuberculosis, influenza, varicela y fiebre tifoidea. Sin embargo, uno de los puntos de mayor dificultad en el desarrollo de una vacuna efectiva se basa en la inducción de una fuerte y duradera respuesta celular de memoria.

En la actualidad, la vacunología reversa y la biología estructural se han constituido como herramientas innovadoras a la hora de seleccionar y diseñar antígenos más efectivos, y la biología de sistemas permite profundizar nuestro conocimiento del efecto que tienen los cambios en los perfiles de expresión génica y de diferenciación y/o activación de diferentes *subsets* celulares en la generación de respuestas protectoras. Es importante destacar además que los conocimientos de la biología de los sistemas de expresión permiten mejorar continuamente los procesos de producción de los inmunógenos.

Utilizando los conocimientos provistos por la inmunología, y con el objeto de aumentar la inmunogenicidad de antígenos simples purificados, diferentes investigadores han usado muy diversas estrategias, entre las que podemos mencionar:

a) acoplamiento a moléculas transportadoras tales como *Keyhole Limpet Hemocyanin* (KLH) o seroalbúmina bovina (SAB) [2], [3], utilización de adyuvantes e inmunomoduladores [4] o conjugación a liposomas o fosfolípidos [5]–[7]. A pesar de su impacto en el aumento de la inmunogenicidad, estas estrategias presentan una serie de desventajas. Por un lado, el acoplamiento químico es un proceso muy costoso, los químicos utilizados son tóxicos (glutaraldehído), carcinogénicos (BDB) o insolubles en agua (MBS), siendo necesario trabajar con dimetilformamida. Además, se requieren varios pasos de purificación para eliminar los químicos que llevan a cabo la reacción y la composición de la preparación es indefinida. Por otro lado, los adyuvantes e inmunomoduladores pueden presentar efectos adversos, por lo que su utilización trata de reducirse al máximo.

b) exposición de epitopes en la superficie de partículas semejantes a virus (VLP, del inglés *virus-like particles*). Las VLP están formadas por proteínas de origen viral capaces de autoensamblarse en partículas semejantes al virus del que derivan al ser expresadas en sistemas heterólogos, aún en ausencia de otros componentes virales. Son consideradas un sistema seguro de presentación de antígenos heterólogos, ya que carecen de genoma viral. Las primeras VLP obtenidas, basadas en el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBV), fueron producidas en sistemas bacterianos y en levaduras. Sin embargo, fue el desarrollo de sistemas de expresión eucariotas y en particular el sistema baculovirus (BV)-

células de insecto lo que permitió el desarrollo y la producción de VLP complejas, basadas en proteínas derivadas de rotavirus [8], [9], virus lengua azul [10], HBV [11] y parvovirus [12], entre otros.

En general, las VLP son estructuras que resultaron ser muy inmunogénicas para respuestas mediadas por células B e inducir fuertes y duraderas respuestas humores mediadas por IgG, aún en ausencia de adyuvantes. Además, son capaces de alcanzar las vías del CMH-I y II *in vivo*, probablemente debido a su naturaleza particulada que permite la incorporación de múltiples epitopes dentro de la célula presentadora [13]–[15]. El tamaño de las VLP parece favorecer su captura por parte de las CD por las vías de macropinocitosis o endocitosis, mecanismos que tienen un rol central en la activación de la respuesta inmune innata y adaptativa [16], [17].

c) expresión de epitopes peptídicos en la superficie de virus que no son patógenos para mamíferos. Por ejemplo, se han expresado en la superficie de bculovirus y células de insecto infectadas pequeños epitopes como así también proteínas derivadas del HIV [18], del virus de la fiebre aftosa [19], [20], de esporozoitos de *Plasmodium berghei* [21], la proteína F de PPRV (*Peste des petits ruminants*) y la proteína H de RPV (*Rinderpest virus*) [22]. Además, los BV poseen la ventaja de ser fácilmente purificados mediante centrifugación. Por otro lado, debido a la estructura espacial de las partículas virales, los antígenos son presentados al sistema inmune de manera multimérica, en presencia de epitopes para células T de la partícula viral, capaces de inducir respuestas humores y celulares. Profundizaremos en la descripción de los BV y sus propiedades inmunológicas en la siguiente sección.

Clásicos y nuevos adyuvantes

Como mencionamos anteriormente, el avance paralelo de las diferentes disciplinas fue crucial para el desarrollo de la vacunología. Particularmente, la biología de sistemas es y será el campo de estudio más útil para explicar la acción de los adyuvantes - conocimiento que permitirá escoger los adecuados para usar en diferentes circunstancias - y para dilucidar las maneras de inducir diferentes *subsets* de células T para influir en la protección.

La palabra adyuvante deriva del latín *adjuvare*, que significa "ayudar", debido a que estos compuestos aumentan la respuesta inmune adaptativa a los antígenos que acompañan. Hasta hace poco, los únicos adyuvantes utilizados en vacunas aprobadas eran las sales de aluminio. Los primeros estudios acerca del modo de acción de los adyuvantes de aluminio evidenciaron la formación de un depósito en el sitio de la inyección, donde el antígeno es liberado lentamente. Los compuestos basados en aluminio, a pesar de ser considerados seguros, son adyuvantes débiles y muy poco consistentes en su capacidad de estimular respuestas inmunes mediadas por células, especialmente respuestas de células T citotóxicas.

El efecto *depot* también ha sido atribuido a los adyuvantes basados en emulsiones de aceite como el adyuvante incompleto de Freund (AIF), permitiendo la estimulación de células productoras de anticuerpos. Este adyuvante no se emplea actualmente en humanos debido a que ocasiona reacciones locales colaterales como la formación de granulomas e inflamación local. Se han evaluado varios tipos de emulsiones con diferentes tipos de aceite, con el propósito de encontrar un adyuvante mejor, estable y no tóxico. Si bien no es considerada segura su aplicación en el hombre, es ampliamente utilizado en medicina veterinaria debido a su potencia y bajo costo.

Es importante destacar que todavía no entendemos completamente el mecanismo de acción de muchos de los adyuvantes que han sido aprobados y utilizados durante años. Históricamente, se pensó que el efecto depósito era el principal, si no único, mecanismo de acción de los adyuvantes. Las sales de aluminio han sido utilizadas desde los años '30, pero sorprendentemente su mecanismo de acción recién en el presente está siendo comprendido. Hoy hemos avanzado y sabemos que estos adyuvantes actúan además como agentes inflamatorios, reclutando células del sistema inmune innato y adaptativo al sitio de inmunización. La liberación de citoquinas y una intervención más eficaz de las células presentadoras de antígeno son claves. El mecanismo de adyuvación también abarca la estimulación de células inmunocompetentes a través de la activación del complemento, la activación de macrófagos y la toma eficiente del antígeno por las CPA, dada su naturaleza particulada.

A medida que la vacunología avanza hacia el desarrollo de antígenos simples, el uso de adyuvantes potentes se hace cada vez más importante. El objetivo es estimular la inmunidad innata como los macrófagos y las células dendríticas que, a su vez, permiten la activación y expansión de células B y T, logrando así una inmunidad adaptativa mejorada, sin necesidad de esquemas de vacunación de múltiples dosis. El desarrollo de adyuvantes de nueva generación es un campo que se encuentra también en pleno auge debido en parte al descubrimiento en forma simultánea de receptores celulares que reaccionan a las señales de peligro, o PAMPs, que las diferentes clases de patógenos poseen.

Así, los esfuerzos se están redirigiendo en pos de desarrollar adyuvantes que activen la inmunidad innata directamente a través de interacciones con receptores celulares, es decir, generar agonistas de los Recetores de Reconocimiento de Patrones o PRRs (del inglés *Pattern Recognition Receptors*). Los primeros receptores que fueron caracterizados pertenecen a la familia de los receptores tipo *Toll* (*TLR*, *Toll-like Receptor*) y los adyuvantes que estimulan TLR4 han sido aprobados para su uso.

Actualmente se están desarrollando agonistas de otros TLR, entre los que podemos mencionar oligonucleótidos conteniendo motivos CpG de DNA no metilado y RNA doble cadena, entre otros. Se piensa que este enfoque es seguro, ya que muchas vacunas actuales (atenuadas o inactivadas) contienen naturalmente PAMPs y se piensa que éstos contribuyen en gran medida a su inmunogenicidad.

Otro adyuvante muy prometedor es el ISCOMATRIX debido a que, al haber sido probado en una serie de modelos animales y en estudios con seres humanos, ha demostrado inducir respuestas inmunes humorales y celulares potentes, duraderas y protectoras.

Finalmente, dado que el perfil de citoquinas es también determinante de la respuesta obtenida, estas moléculas pueden emplearse para potenciarla o redirigirla.

En todos los casos mencionados, el objetivo es la estimulación de células de la interfase entre el sistema inmune innato y adaptativo, que indirectamente impactará en determinados *subsets* de células T CD4+ como Th1, Th2 o Th17, o de células T citotóxicas CD8+, con el fin de proporcionar una coincidencia más exacta con los correlatos inmunes deseados de protección.

Las estrategias elegidas para montar respuestas inmunes celulares se basan en el desarrollo de vectores virales o bacterianos replicativos y no replicativos o en la inoculación de ácidos nucleicos codificantes para antígenos relevantes [23]. De esta manera, estos vectores pueden alcanzar CPAs y sintetizar polipéptidos antigénicos *de novo*, que se cargarán en moléculas del CMH-I. Por otro lado, es posible aprovechar la capacidad que algunas células CPAs tienen para incorporar antígenos exógenos, hidrolizarlos parcialmente y exponerlos en su membrana en el contexto de moléculas CMH-I. Este proceso es conocido como presentación cruzada, *cross-presentation* o *cross-priming*. En particular, las células dendríticas pueden presentar de manera cruzada epitopes derivados de antígenos provenientes de células infectadas o antígenos solubles exógenos, aunque los primeros mucho más eficientemente [24]. El desarrollo de VLPs ha sido una herramienta de gran utilidad para aumentar la respuesta inmune contra epitopes o cortas secuencias transportadas en las partículas. Las mismas tienen la particularidad de autoensamblarse formando partículas que imitan la estructura viral pero carecen de material genético infeccioso, llevan múltiples copias del antígeno en un diseño repetido y son fácilmente endocitadas por CD [14]. Estas características hacen de las VLPs estructuras muy inmunogénicas para las células B e inducen fuertes y duraderas respuestas humorales a IgG, aún en ausencia de adyuvantes, aunque probablemente debido a su naturaleza particulada, también son capaces de alcanzar la vía del CMH-I *in vivo*. Sin embargo, son también necesarias señales coestimulatorias disparadas por CDs previamente activadas de manera adecuada para despertar una respuesta citotóxica efectiva. La activación de las CDs es un paso central en la activación de los linfocitos T CD8+ en el desarrollo de una respuesta celular [25].

Los BV como inmunomoduladores

Los BV son una familia de virus (*Baculoviridae*) específicos de artrópodos que se encuentran ubicuamente en el ambiente y han sido aislados de más de seiscientas especies de insectos [26], [27]. Por muchas décadas, los BV han sido utilizados para el control de plagas. Estos virus poseen un ciclo de vida bifásico, con **virus ocluidos** dentro de una matriz proteica (responsables de la transmisión vertical, entre individuos) y **virus brotados** (responsables de la transmisión horizontal entre células). Sus genomas de DNA circular de cadena doble poseen un tamaño de entre 80-180 kpb, codifican más de 4000 genes [27] y están empaquetados en una nucleocápside compuesta mayoritariamente por la proteína VP39 [28]–[31] dispuesta en anillos apilados [32]. La nucleocápside posee una típica forma en bastón asimétrica de 40-70 nm de diámetro y 250-400 nm de largo [33], [34], cuyo tamaño está determinado por el largo del genoma, con una base en un extremo y un ápice en el otro [32], [35]. Los virus brotados poseen una envoltura que lleva la glicoproteína GP64 como componente mayoritario [36], la cual se ubica en un extremo del virión que se denomina peplómero y que coincide con el ápice de la nucleocápside. Esta proteína posee N-glicosilaciones que son adquiridas en el tránsito por el retículo endoplasmático y aparato de Golgi y son incorporadas en los BV durante el brotado de las nucleocápsides. El brotado desde el citoplasma al medio extracelular, como también la adhesión y la entrada de los BV a las células, se deben a esta proteína [37]–[39] (Fig. I4).

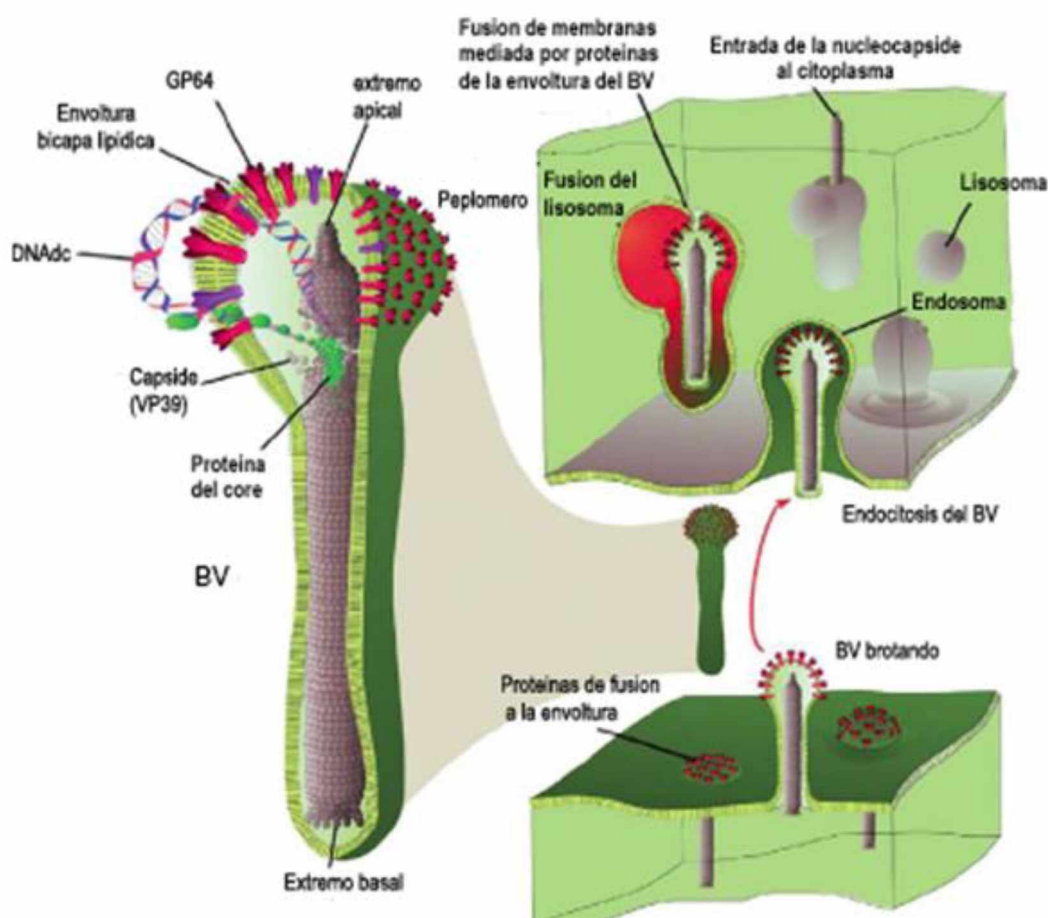


Figura I4. Esquema del BV y mecanismo de infección de virus brotados. La ilustración de la izquierda representa la estructura de los BV. El genoma de DNA se muestra expandido por fuera de la nucleocápside. En la región del peplómero se representan algunas de las proteínas de fusión de la envoltura. La ilustración de la derecha muestra cómo una nucleocápside brota desde una célula infectada (abajo) en la región donde se encuentran concentradas las proteínas de fusión de la envoltura, adquiriendo estas proteínas y la membrana celular como envoltura del virión. El BV penetra en una nueva célula vecina (arriba) por endocitosis mediada por receptor y la nucleocápside es liberada al citoplasma luego de la fusión de la envoltura viral y la membrana endosomal inducida por el cambio de conformación de la proteína de envoltura GP64 durante la maduración del endosoma (acidificación). Finalmente, la nucleocápside alcanza el núcleo. Modificado de Slack y Arif (2007) [27].

Existen evidencias sólidas que demuestran fehacientemente la capacidad adyuvante de los baculovirus para el sistema inmune de los mamíferos [40]–[42]. Esta capacidad está en parte mediada por la activación de la inmunidad innata. En particular, los baculovirus son capaces de interactuar con el TLR9 intracelular de macrófagos primarios peritoneales y células dendríticas CD11c+ a través de motivos CpG de su genoma e inducir la producción

de IL-12, IL-6, TNF- α e interferones de tipo I [43], [44]. Se ha probado que los receptores *Toll-like* (TLRs) juegan un rol crucial en el reconocimiento de componentes bacterianos y virales. Tras la infección por microorganismos, los TLRs reclutan un conjunto de moléculas adaptadoras que incluyen a TIRAP, TRIF, TRAM y MyD88, las que disparan la activación de factores de transcripción esenciales para la producción de citoquinas proinflamatorias e interferones de tipo I. Sorprendentemente, experimentos desarrollados por Abe y colaboradores y por nuestro grupo han demostrado que los baculovirus salvajes de la especie *AcMNPV* fueron capaces de conferir protección a ratones contra un desafío letal con virus Influenza y el virus de la fiebre aftosa, respectivamente [41], [45]. Además, se demostró que la coadministración de baculovirus con ovoalbúmina aumenta notablemente las respuestas inmunes adaptativas humorales y mediadas por células en ratones y que su capacidad adyuvante es eliminada cuando los baculovirus son inactivados física o químicamente [43]. Más aún, se probó que gran parte de la respuesta inmune a VLPs producidas en cultivos de células de insecto se debían a la presencia de trazas de baculovirus contaminantes de las preparaciones antigénicas [43]. Por otro lado, nuestro grupo demostró recientemente que sólo el fenotipo brotado y no el derivado de los cuerpos de oclusión promueve la maduración de células dendríticas y la generación de potentes respuestas celulares (en particular mediadas por TCD8+) contra los antígenos coadministrados, a pesar de compartir la gran mayoría de los componentes moleculares [46].

Dado que los baculovirus y los mamíferos no han compartido su evolución, estos virus no desarrollaron mecanismos de evasión de las respuestas innatas, hecho que puede ser aprovechado en el desarrollo de herramientas de vacunación y antivirales.

La fiebre aftosa y la importancia de las vacunas de nueva generación

La fiebre aftosa es una enfermedad vírica grave del rebaño, sumamente contagiosa y de repercusiones económicas considerables. Afecta a bovinos y porcinos, así como a los ovinos, caprinos y otros rumiantes biungulados. Todas las especies de ciervos y antílopes,

incluyendo elefantes y jirafas, son susceptibles a esta enfermedad. En una población susceptible, la morbilidad es de casi un 100%, siendo los animales de cría intensiva más susceptibles que las razas tradicionales. La enfermedad es rara vez fatal en los animales adultos, pero la mortalidad entre los animales jóvenes suele ser alta debido a la miocarditis o a la falta de amamantamiento cuando la madre está afectada por la enfermedad. La fiebre aftosa se caracteriza por fiebre y úlceras en forma de ampollas en la lengua y labios, en la boca, en las ubres y entre las pezuñas. Ocasiona graves pérdidas de producción debido a la pérdida de peso causada por una reducción del apetito, y una caída de la producción de leche. Aunque la mayoría de los animales afectados se recupera, la enfermedad a menudo los deja debilitados, con el consecuente impacto sobre las tasas de crecimiento o de producción lechera. Por otro lado, los animales que se han recuperado de la infección pueden a veces ser portadores del virus e iniciar nuevos focos de la enfermedad.

El agente causante de la enfermedad es el virus de la fiebre aftosa (FMDV), un virus desnudo de genoma a RNA, de la familia *Picornaviridae* y género *Aftovirus*. Se distinguen siete serotipos (A, O, C, SAT1, SAT2, SAT3, Asia1) que no confieren inmunidad cruzada, por lo que se necesita una vacuna específica para cada uno de ellos. Los errores durante el proceso replicación del RNA viral, eventos de recombinación y la selección en diferentes hospedantes son las causas de la generación constante de nuevas variantes virales.

Con respecto a su estabilidad, el virus es capaz de persistir en los ganglios linfáticos y la médula ósea a pH neutro, pero se inactiva en el músculo después del *rigor mortis*, cuando el pH alcanza valores menores a 6,0. Se conserva en la médula ósea congelada o en los ganglios linfáticos [47]. Se puede encontrar virus residual en la leche y los productos lácteos, incluso después la pasteurización regular, pero es inactivado por ultra pasteurización de alta temperatura. Sobrevive al secado y puede persistir durante días o semanas en materia orgánica en condiciones de humedad y temperaturas frescas. Puede persistir en el forraje contaminado y en el ambiente por hasta 1 mes, dependiendo de las condiciones de temperatura y pH. Tratamientos con pH <6,0 o > 9,0 permiten su rápida inactivación y, si

bien la refrigeración y congelación lo conserva, el virus es inactivado progresivamente a temperaturas superiores a los 50°C.

La importancia de la fiebre aftosa está ligada no sólo a estabilidad en condiciones ambientales normales, sino también a la facilidad con la cual el virus se difunde. Puede detectarse en todas las excreciones y secreciones de los animales infectados y en la leche y el semen, incluso hasta 4 días antes de que el animal muestre signos clínicos de la enfermedad. Los animales infectados liberan una gran cantidad de virus en forma de aerosol y pueden infectar a otros animales directamente por vía respiratoria u oral. Asimismo, el contacto directo con objetos inanimados contaminados (calzado, ropa, vehículos, etc.) también constituye una fuente de contaminación [47]. Si bien no es considerada una enfermedad zoonótica, el hombre puede albergar el virus en sus vías respiratorias durante 24 a 48 horas, lo que lleva a la práctica común de 3 a 5 días de cuarentena para el personal expuesto en las instalaciones de investigación. La dispersión aérea incrementa la gravedad de la situación, especialmente zonas templadas.

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, <http://www.oie.int/es/>) es el organismo internacional encargado de reconocer el estado sanitario de un país o zona con respecto a las enfermedades de los animales. En particular, para la fiebre aftosa, dicho estatus sanitario comprende las siguientes categorías:

- libre de fiebre aftosa sin vacunación (país o zona)
- libre de fiebre aftosa con vacunación (país o zona)

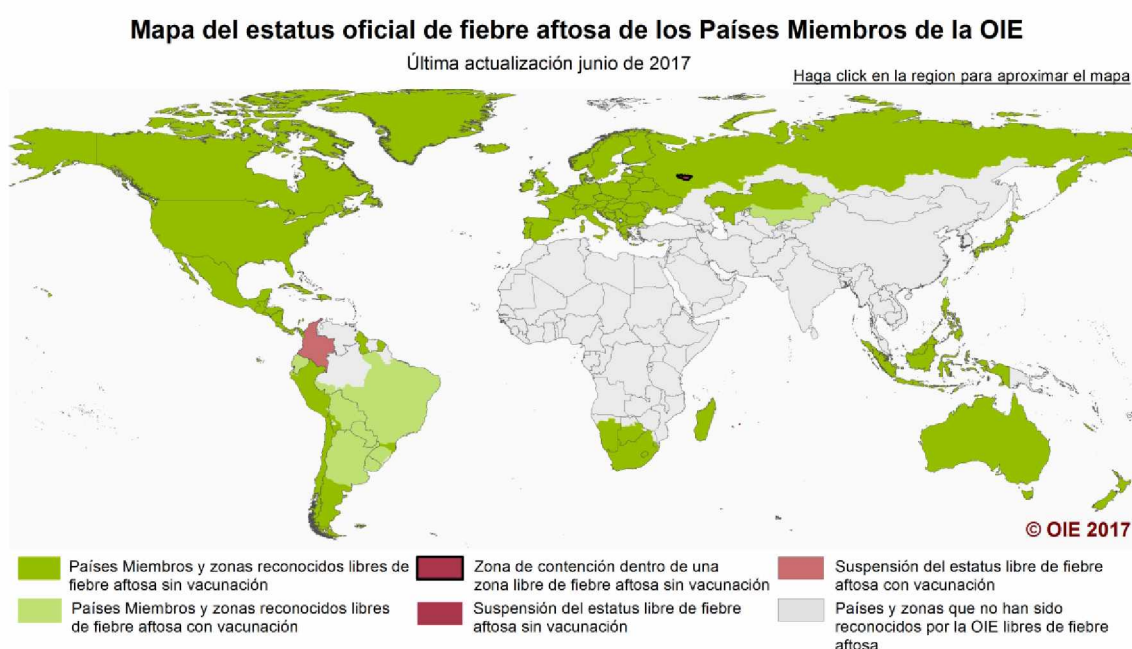


Fig. I5: Mapa mundial actual del estatus oficial de fiebre aftosa. La OIE clasifica a los Países Miembros reconocidos como libres de fiebre aftosa en dos categorías, según apliquen o no vacunación, de acuerdo con las disposiciones del Capítulo 8.8. del Código Terrestre, Edición 2016.

La República Argentina, por la labor realizada con la aplicación de las estrategias definidas en el Plan Nacional de Erradicación que llevaron a la superación de la epidemia 2000-2001 y a las medidas que controlaron las posteriores reintroducciones, ha logrado el reconocimiento de la OIE de las diferentes zonas libres de fiebre aftosa que en conjunto ocupan todo el territorio nacional.



Fig. I6: Mapa del status sanitario actual en todo el territorio argentino. La OIE reconoce zonas libres de la enfermedad con o sin aplicación de protocolos oficiales de vacunación.

Por el suelo, clima, densidad ganadera, dinámica de movimientos y demás propiedades de la estructura productiva, en la Argentina se pueden diferenciar varios ecosistemas con relación a la fiebre aftosa. El agrupamiento en dos grandes zonas sirvió de fundamento para implementar la estrategia de control y aplicación:

- Una zona de producción bovina de alta concentración y movilidad, que comprende el norte, centro y este del territorio (que respondía a la característica de zona endémica cuando se hallaba presente la enfermedad); y
- Una zona al sur del Río Negro, de muy baja producción bovina, con un relieve de meseta árida de grandes extensiones, con muy baja tasa de contacto, más propicia a la producción ovina para lana, poca y dispersa población humana, que fue caracterizada como Ecosistema Naturalmente Libre.

El estatus sanitario de las 5 zonas se ratifica todos los años desde que es obligatorio dicho trámite por la OIE (Código Terrestre, 2007). Se fundamenta la ratificación con los resultados de la vigilancia epidemiológica que, con la aplicación de muestreos serológicos y atención de denuncias y sospechas, demuestra que se mantiene la condición sanitaria de libre de fiebre aftosa en las distintas zonas del país. El Plan Nacional de Erradicación tiene como una de sus principales estrategias la vacunación obligatoria de todos los bovinos/bubalinos en una zona denominada Centro Norte, que la OIE ha reconocido como libre de fiebre aftosa con vacunación. Las características de la estrategia son:

- Sólo se aplica en bovinos/bubalinos.
- Se utiliza una vacuna tetravalente, inactivada con etilenimina binaria (BEI), formulada con adyuvante oleoso y saponina; contiene las cepas O1 Campos, A24 Cruzeiro, A Argentina 2001, C3 Indaial y son elaboradas por laboratorios privados nacionales y autorizadas por el SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, www.senasa.gob.ar).
- La responsabilidad de la aplicación está delegada en Entes Sanitarios Locales (ESL). Distribuidos en todo el país hay 310 de estas entidades sin fines de lucro que

están conformadas por representantes de las asociaciones de los ganaderos, que cuentan con la asistencia técnica de instituciones sanitarias nacionales y provinciales (incluyendo a veterinarios locales del SENASA y también veterinarios de la actividad privada).

- Para el momento de la aplicación de la vacuna se considera la categoría etárea de los animales, de manera que los animales menores (en general, todas las categorías menos vacas y toros) reciben dos dosis anuales en dos campañas que se definen a nivel local, y los animales mayores reciben una dosis anual en una de las dos campañas. Cada distrito desarrolla su propio Plan local de vacunación, conforme a la estrategia general establecida por el SENASA. El plan debe tener consenso en los niveles provincial (Comisiones provinciales de sanidad animal - Coprosas), y nacional (Comisión Nacional de Lucha contra la Fiebre Animal- Conalfa) para su aprobación.

- Dentro de la zona con vacunación, cuando se diseñó el componente de la vacunación como una estrategia del Plan de Erradicación, se consideró la variedad de ecosistemas, las características productivas de cada pequeña región y los circuitos comerciales. Es por ello que coexisten distintas modalidades de aplicación de la vacuna, mediante las cuales se aplican anualmente en una o dos campañas, cerca de 80 millones de dosis.

La República Argentina cuenta con laboratorios habilitados para elaborar vacunas antiaftosa con capacidad de producción suficiente para atender la demanda de vacunas de todo el país, siendo Biogénesis-Bagó la empresa líder en el mercado. La totalidad de las series de vacunas producidas en el país son controladas por la Coordinación General de Laboratorio Animal dependiente de la Dirección de Laboratorios y Control Técnico (Dilacot) del SENASA, acorde a las recomendaciones del Manual de Pruebas Diagnósticas y Vacunas para Animales Terrestres de la OIE (Capítulo 2.1.10). El laboratorio del SENASA es laboratorio de referencia de OIE para fiebre aftosa y está acreditado por el Organismo Argentino de Acreditación (OAA) bajo la norma ISO 17.025. Cada ente sanitario local, bajo la supervisión de un veterinario del SENASA, maneja la provisión de

vacunas a nivel local, el mantenimiento de la cadena de frío y la implementación y registro del proceso de vacunación, con gastos cubiertos por los productores. Con el objetivo de lograr un alto porcentaje de animales vacunados y que ello sea compatible con un adecuado nivel de inmunidad poblacional del rodeo bovino y bubalino a nivel local, el veterinario oficial es el responsable del plan de vacunación y supervisa todo el desarrollo y ejecución de las campañas y sus registros. La Dirección de Epidemiología y Análisis de Riesgo, junto con el Programa de Fiebre Aftosa, por medio del “Sistema de Integrado de Gestión de Sanidad Animal”, evalúa los planes locales y los entes sanitarios locales, a fin de conocer su desempeño, y si corresponde, implementar acciones correctivas.

Si bien la vacunación con virus inactivado químicamente como antígeno [48] permitió reducir y controlar los brotes, una vez erradicada la enfermedad, existe un número de limitaciones e inconvenientes con esta tipo de vacunas, relacionados principalmente con la necesidad de contar con instalaciones especializadas de contención para la producción de masa antigénica y su formulación, debido al riesgo de escape de virus [49]. Por otro lado, los requerimientos especiales de producción, transporte y almacenamiento incrementan drásticamente el valor de la dosis.

Respecto a la respuesta generada, tanto en animales infectados como en los vacunados, el virus despierta una rápida respuesta inmune humoral responsable de la protección serotipo específica que correlaciona generalmente con altos niveles de anticuerpos neutralizantes [50]. Esta repuesta humoral protectora está dirigida principalmente a epitopes presentes en las tres proteínas estructurales externas, VP1, VP2 y VP3 [51]–[53]. De todos ellos, los epitopes presentes en el *loop G-H* de la superficie de VP1 son los de mayor capacidad neutralizante [51], [52], [54]–[57]. Se ha sugerido que la inmunidad mediada por células T citotóxicas es responsable de la depuración de virus en animales persistentemente infectados [58]–[61] que constituyen un riesgo para el estado sanitario de todo el rodeo.

Para que una vacuna de nueva generación contra la fiebre aftosa pueda ser considerada una alternativa, debe cumplir ciertas características importantes: seguridad en la producción

y aplicación, inducción de una rápida y efectiva respuesta tras la inoculación, compatibilidad con los principios DIVA de diferenciación entre animales vacunados e infectados y su conveniencia en cuanto a costos. De las diferentes estrategias ensayadas en el desarrollo de nuevas vacunas para la fiebre aftosa, es posible rescatar algunas características que pueden sobrepasar las dificultades que implica el uso de la actual vacuna inactivada en escenarios de erradicación. Así, se han hecho intentos para desarrollar vacunas atenuadas mediante ingeniería genética, mediante el empleo de péptidos sintéticos o subunidades proteicas, empleando estrategias de producción de cápsides vacías o sectorizadas por virus. Respecto de las vacunas atenuadas, tal vez uno de los principales riesgos se relacione con la capacidad de reversión, ya sea espontánea o mediante la recombinación con virus naturales. Sin embargo, es también una dificultad la imposibilidad o dificultad para diferenciar con claridad animales vacunados de infectados. De todas maneras, se ha descrito el desarrollo de cepas atenuadas genéticamente marcadas basadas en deleciones de las proteínas L^{pro} y una copia de 3B, obteniendo una protección de 100% en bovinos tras el desafío con una cepa homóloga [62].

En terminos de seguridad, las vacunas basadas en péptidos sintéticos se presentan como altamente seguras. Una vez identificadas las regiones inmunodominantes de la proteína estructural VP1 como el *loop G-H* (aminoácidos 140 a 160) y la porción carboxiterminal (aminoácidos 200 a 213), numerosos trabajos han descrito la inmunización con péptidos sintéticos. A pesar de su seguridad, los mayores inconvenientes relacionados con su desarrollo se relacionaron con su muy baja inmunogenicidad y la aparición de variantes de escape a la neutralización [63]. Se ha propuesto que la presentación como péptidos dendriméricos puede aumentar su eficacia, en particular si se agregan epitopes Th adicionales y no restrictos a pocos alelos CMH [64] y secuencias de direccionamiento a CD, aunque esto último sólo ha sido sugerido teóricamente.

Sin dudas, uno de los más promisorios desarrollos basados en proteínas recombinantes ha sido el desarrollo de VLPs o cápsides vacías basadas en la expresión conjunta del polipéptido P1 precursor de las cuatro proteínas estructurales junto con la proteasa 3C en el sistema baculovirus-células de insecto o larvas de gusano de seda y en células de mamífero

infectadas con virus vaccinia recombinantes. Estas estructuras tienen la ventaja de imitar espacialmente los epitopes conformacionales presentes en la partícula viral, con la ventaja adicional de no incorporar genoma viral en su interior, dotándolas de gran seguridad. Esta última característica, sin embargo, probablemente sea responsable de su disminuida inmunogenicidad comparada con la de partículas virales inactivadas, ya que el RNA genómico es detectado como PAMP por las células del sistema inmune.

Esta estrategia fue abordada también mediante el empleo de vectores virales. Así, se han llevado a cabo ensayos de vacunación experimental con vectores basados en Adenovirus tipo 5 competentes en replicación codificando el polipéptido P1 precursor de las cuatro proteínas estructurales, en los que se protegió parcialmente cerdos, aunque esta estrategia no fue capaz de despertar una respuesta inmune humoral neutralizante (Mayr et al., 2001; Moraes et al., 2002).

Como se mencionó, si bien la respuesta celular mediada por linfocitos T citotóxicos juega un papel central en la inmunidad contra patógenos intracelulares como los virus, su rol en la inmunidad protectora contra FMDV fue mucho menos estudiado que el de la inmunidad mediada por anticuerpos. En parte, esto se debe a las dificultades técnicas para establecer ensayos apropiados y a que el virus no sólo tiene un muy rápido ciclo lítico de replicación, sino que además produce una fuerte inhibición en la síntesis y transporte de moléculas del CMH, por lo que en general no se produce una fuerte respuesta CTL por la infección natural. A pesar de esto, no debemos descartar que la inducción de una respuesta inmune específica mediada por LTCD8+, que además puede ser más promiscua entre serotipos, resulte complementaria a la protección conferida por anticuerpos, en especial en animales *carrier*.

De lo expuesto anteriormente se desprende la importancia de desarrollar una vacuna de nueva generación que permita complementar o incluso reemplazar a la ya existente, en particular en escenarios de erradicación. Teniendo en cuenta además la importancia tanto de la generación de anticuerpos como de una respuesta mediada por células T CD8+, resulta prometedor el estudio de nuevas estrategias de presentación antigénica mediada por

vectores virales que combinen las propiedades de seguridad que las vacunas no replicativas poseen y la elección de un sistema de producción compatible con los costos de producción a gran escala de vacunas veterinarias.

De esta manera, en este trabajo de tesis propusimos evaluar la factibilidad de combinar en vectores virales no replicativos basados en baculovirus las propiedades adyuvantes e inmunomoduladores de los viriones brotados de *AcMNPV*, la capacidad de transportar antígenos heterólogos en la partícula viral o transducir sus secuencias codificantes y la facilidad biotecnológica de producción. En primera instancia, empleando antígenos modelo, se determinó la influencia de la localización diferencial en cápside y superficie o la expresión a partir de un promotor de mamífero en el tipo e intensidad de la respuesta inmune, así como el efecto de la inclusión de adyuvantes en las preparaciones vacunales. A partir de los resultados obtenidos, se diseñó y evaluó un inmunógeno experimental contra el FMDV del serotipo A2001 en el modelo murino.

Hipótesis y Objetivo general

El presente proyecto tiene como objetivo diseñar de manera racional un candidato vacunal recombinante contra la fiebre aftosa basado en vectores baculovirales. Tiene como hipótesis que la localización de antígenos en diferentes posiciones de la partícula viral, en combinación con las propiedades antivirales, de presentación multimérica, de inmunomodulación y facilidad de producción biotecnológica del baculovirus *AcMNPV*, redundarán en un efecto sinérgico, brindando sólidas respuestas inmunes humorales y celulares. Tiene como finalidad contribuir al control de enfermedades de interés veterinario empleando estrategias combinadas de presentación antigénica y antivirales. Para el diseño racional, en primer lugar definiremos las implicancias de la localización del antígeno en la partícula viral y la estrategia de presentación, así como el efecto de la formulación de los baculovirus recombinantes con diferentes adyuvantes de uso veterinario aprobado en los diferentes tipos de respuesta. Los resultados obtenidos empleando un antígeno modelo serán luego aplicados al diseño y evaluación de un BV recombinante que transporte antígenos específicos como candidato vacunal para FMDV-A/Arg/2001.

MATERIALES Y

MÉTODOS GENERALES

Células, virus y animales.

Cepas bacterianas

Para las estrategias de clonado se utilizó la cepa DH5 α de *E. coli* de genotipo: supE44 thi-1 recA1 gyrA (NaI^r) relA1 Δ (lacIZYA-argF)U169 deoR (ϕ 80dlac Δ lacZ)M15.

Para la generación de bácmidos recombinantes se utilizó la cepa de *E. coli* DH10Bac (Invitrogen) cuyo genotipo es: F⁻ mcrA Δ (mrr-hsd RMS-mcr BC) ϕ 80 d lac ZDM15 Δ lacx74 deo R recA1 end A1 araD139 Δ (ara, leu) 7697 gal U gal K λ ⁻¹ rps LnupG.

Los cultivos líquidos se realizaron en medio LB (5 g/l Triptona, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl), con agitación constante de 200 rpm a 37 °C. Los cultivos en medio semisólido se realizaron en el mismo medio, solidificado mediante el agregado de agar a una concentración final de 1,5 gr/100 ml. Las cepas bacterianas transformadas con los diferentes vectores plasmídicos se crecieron en medio de cultivo LB en presencia del antibiótico de selección adecuado.

Células de insecto

Se utilizaron células de insecto de la línea Sf9, (un clon aislado de la línea IPLBSF21-AE, ATCC), derivada de tejido ovárico del lepidóptero *Spodoptera frugiperda*. Las células se crecieron a 27 °C en forma de monocapa en medio de cultivo TNM-FH (Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino(SFB) (Internegocios-SA) y una solución de antibiótico-antimicótico (penicilina 10.000 U/ml, estreptomicina 10 mg/ml, anfotericina B 25 μ g/ml, Gibco-BRL).

Células de mamífero

Se utilizaron células de mamífero de la línea BHK-21 (ATCC) derivada de tejido de riñón de hámster. Las células se crecieron en forma de monocapa 37 °C en estufa gaseada conteniendo 5% de CO₂. El medio de cultivo utilizado fue D-MEM (Invitrogen) suplementado con 10% SFB (Internegocios-SA) y una solución de antibiótico-antimicótico (penicilina 10.000 U/ml, estreptomicina 10 mg/ml, anfotericina B 25 μ g/ml, Gibco-BRL).

Virus

El baculovirus utilizado en este trabajo fue el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcMNPV). Su multiplicación se realizó en células Sf9 crecidas en forma de monocapa a 27 °C. El medio de cultivo utilizado fue TNM-FH (Sigma) suplementado con 10% SFB (Internegocios-SA) y una solución de antibiótico-antimicótico (penicilina 10.000 U/ml, estreptomicina 10 mg/ml, anfotericina B 25 µg/ml, Gibco-BRL). Los *stocks* virales de uso se obtuvieron luego de dos o tres pasajes de virus por células Sf9 a una baja multiplicidad de infección (moi 0,1 – 0,01).

Cepas de ratones

Se utilizaron ratones hembra, libres de patógenos especificados (SPF, del inglés *Specific Pathogen Free*), de las cepas Balb/c y C57BL/6J. Los ratones se obtuvieron del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (progenitores procedentes del Jackson Laboratory, USA).

Metodología del DNA recombinante

Minipreparaciones de DNA

Se utilizó el método de Birnboim y Doly con ligeras modificaciones. Se partió de 3 ml de cultivo de bacterias en medio LB/antibiótico crecido toda la noche a 37 °C. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 10.000 x g en una microcentrífuga de mesa y se resuspendieron en 200 µl de Solución I (Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM, glucosa 50 mM). Luego, se agregaron 200 µl de Solución II (NaOH 0,2 N, SDS 1 %) se mezcló suavemente por inversión y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Finalmente se agregaron 200 µl de Solución III (acetato de potasio 3 M) y se mezcló por inversión. Se centrifugó el floculado a 10.000 x g durante 10 min. Se tomó el sobrenadante y se traspasó a un tubo de microcentrífuga limpio, donde se precipitó el DNA plasmídico por el agregado de 0,6 volúmenes de isopropanol y centrifugación a 10.000 x g durante 20 min. Se enjuagó

el precipitado con etanol 70 %, se secó bajo vacío y se resuspendió en 50 µl de H₂O conteniendo RNAasa (100 µg/ml).

Para verificar la presencia, integridad y orientación de los diferentes insertos en cada estrategia de clonado, se digirieron de 2 a 6 µl de esta solución con las enzimas de restricción apropiadas.

Preparación de DNA plasmídico de alta calidad

Para la obtención de DNA plasmídico de alta calidad se utilizó el kit comercial *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN) siguiendo las especificaciones del fabricante. Las concentraciones típicas obtenidas fueron de 300 a 500 ng/µl.

PCR de alta fidelidad

Todas las reacciones de amplificación de DNA para obtener secuencias que posteriormente formarían parte de algún vector de transferencia fueron realizadas utilizando la enzima *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity* (ThermoFisherScientific) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante y utilizando como volumen final de reacción 25 µl. En todos los casos se utilizaron aproximadamente 50ng de templado y la T de *annealing* seleccionada fue de 5°C por debajo de la T de *melting* del primer de menor T_m. Se realizaron 35 ciclos de reacción y se analizaron 10ul del producto por electroforesis en gel de agarosa. El DNA restante fue conservado hasta -20°C hasta su utilización.

Secuenciación de DNA

Se realizó en el Servicio Interno de Genotipificación y Secuenciación Automática (SIGYSA) del Instituto de Biotecnología mediante secuenciación automática utilizando el equipo Genetic Analyzer 3130x1 (Applied Biosystems).

Digestión con enzimas de restricción

Para las digestiones de los diferentes plásmidos se utilizaron enzimas de restricción NEB (New England Biolabs). Cantidades del orden de los 500 ng de DNA fueron digeridas en un volumen final de 20 µl siguiendo las especificaciones para cada enzima.

Defosforilación de los extremos 5' fosfato

La reacción de remoción de los grupos fosfato de los extremos 5' de los plásmidos digeridos se realizó utilizando la enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIP, New England Biolabs) agregada directamente al volumen de reacción de digestión. Se utilizaron 5 U por µg de DNA y la reacción se incubó por 15 min a 37 °C.

Incorporación de nucleótidos a fragmentos cohesivos de DNA

Para generar extremos romos en fragmentos de DNA con extremos cohesivos, se utilizó el fragmento *Klenow* de la enzima DNA polimerasa (New England Biolabs). Para esto se agregaron directamente en la reacción de digestión 10 U del fragmento *Klenow* por cada µg de DNA molde. La reacción se incubó 30 min a 37 °C. Para las reacciones de generación de extremos romos por adición de nucleótidos, se agregaron además cada uno de los dNTPs a una concentración final de 2,5 mM .

Electroforesis en geles de agarosa

Las diferentes moléculas de DNA se resolvieron en geles de agarosa de 1 % conteniendo bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml empleando *buffer* TAE (Tris-acetato 10 mM, EDTA 1 mM) a 5-10 V/cm a temperatura ambiente. Para sembrar las muestras se utilizó un *buffer* de siembra de concentración 10X (glicerol 50 %, TAE 10X, azul de bromofenol 1 %). Los marcadores de peso molecular utilizados fueron 1 kb y 1 kb Plus (Invitrogen, NEB o PBL). Los geles fueron fotografiados utilizando un equipo Fotodyne y el programa Collage (Macintosh).

Purificación de DNA a partir de geles de agarosa

Las bandas de DNA resueltas mediante geles de agarosa se escindieron del gel mediante el uso de bisturí y se purificaron utilizando el kit *QIAEX II purification system* (QIAGEN). El DNA obtenido se resuspendió en una solución de Tris-HCl 10 mM pH 8 siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Cuantificación de DNA

Se utilizó el equipo *Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer* (NanoDrop Technologies Inc.) para cuantificar el DNA obtenido a partir de kits comerciales.

Reacciones de ligado molecular

Para el ligado molecular de los diferentes insertos a los plásmidos correspondientes, se utilizó la enzima T4 DNA ligasa (Epicentre). Siguiendo las especificaciones del fabricante y utilizando entre 50 y 100 ng de vector, se realizaron diferentes reacciones de ligado empleando relaciones molares vector: inserto (1:1 y 1:3). Se incluyó además un control de vector sin inserto. La ligación de extremos cohesivos se realizó por incubación a TA durante 1 h. Para extremos romos se incrementó el tiempo de incubación a 3 hs o se realizó ON a 16 °C.

Transformación de bacterias

Mediante el método de Hanahan (1985) se obtuvieron bacterias *E. coli* DH5 α competentes para la transformación, se fraccionaron en alicuotaron de 50 μ l y se mantuvieron congeladas a -80 °C. Al momento de usar, se descongelaron en hielo y se agregaron 5 μ l del producto de las diferentes reacciones de ligado, se mezcló suavemente y se incubó en hielo por 30min. Posteriormente se realizó un choque térmico a 42 °C por 90 s y se dejó en hielo por 2 min adicionales. Luego, se agregaron 200 μ l de medio LB, se incubó a 37 °C por 30 min con agitación suave y se plaqueó en medio LB-agar conteniendo el antibiótico de selección. Las placas se incubaron a 37 °C toda la noche y las colonias se

picaron con escarbadiantes esterilizados, que se usaron para inocular cultivos de 3 ml de LB/antibiótico.

Se generaron bacterias *E. coli* DH10Bac competentes por la misma metodología y se transformaron utilizando el mismo protocolo pero empleando las siguientes modificaciones: el choque térmico se realizó por 45 s y para la recuperación de las bacterias se utilizaron 900 µl de medio SOC y 4 hs de incubación con agitación suave.

PCR de bácmidos

La confirmación del evento de transposición en los clones *E. coli* DH10Bac se realizó por PCR utilizando la enzima *GoTaq® DNA Polymerase* (Promega) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante y utilizando como volumen final de reacción 10 µl. 1 µl de una dilución 1 en 10 de la minipreparación de DNA fue utilizado como templado y la T de *annealing* seleccionada fue de 5°C por debajo de la T de *melting* del primer de menor T_m. Se realizaron 35 ciclos de reacción y el producto fue analizado por gel de agarosa.

Metodología para la determinación de proteínas

Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Se utilizaron geles desnaturalizantes de poliacrilamida de concentraciones 12 % y 15 %, dependiendo del tamaño de la proteína a ser visualizada en cada caso. El grado de entrecruzamiento acrilamida:bisacrilamida utilizado fue 29:1. Se utilizaron minigeles (6 x 9 cm, Miniprotean III, Biorad), los que se corrieron a una corriente constante de 100V en *buffer* Tris-glicina-SDS (Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 190 mM, SDS 0,1 %).

Electrotransferencia

Luego de efectuada la electroforesis, los geles de poliacrilamida se equilibraron durante 2 min con *buffer* de transferencia (Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 190 mM, metanol 20 %). Se hidrataron rectángulos de nitrocelulosa (S&S BA 0,45 µm, Schleicher & Schuell) de

tamaño algo mayor que el del gel durante 5 min. Para cada gel se armó un *cassette* de transferencia conteniendo una esponja del tipo *Scotch Brite* (Bio-Rad), un papel de filtro Whatmann de 3 mm, el gel de poliacrilamida, el filtro de nitrocelulosa, un papel de filtro Whatmann y una esponja del tipo *Scotch Brite*. Se montó el *cassette* dentro de la cuba de transferencia (Bio-Rad) orientado con el electrodo negativo más cercano al gel y el positivo cercano a la membrana, se llenó con *buffer* de transferencia y se transfirieron las proteínas del gel al filtro de nitrocelulosa aplicando una corriente constante de 200 mA a 4 °C por 1,5 h.

Identificación de proteínas mediante *Western blot*

Se bloquearon los filtros 1 h a temperatura ambiente en *buffer* TBS-Tween-leche 5% (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 0,005 %, leche descremada 5 %). Luego, se lavaron con *buffer* TBS-Tween y se incubaron con diluciones apropiadas de los anticuerpos específicos (1:2.000 para el monoclonal anti-VP39 [65]; 1:2.000 para el monoclonal AcV5 anti-GP64 SIGMA; 1:1.000 para el monoclonal anti-GVSV SIGMA; 1:1.000 para el suero policlonal de conejo anti-ovoalbúmina de pollo; 1:1.000 para el suero policlonal de conejo anti-A2001) en TBS-Tween-leche descremada 3 %. Tras 1 h de incubación a temperatura ambiente con agitación suave, se lavaron los filtros 3 veces con solución de lavado TBS-Tween por 10 min y se incubaron con el segundo anticuerpo en TBS-Tween-leche 3 % (1:1.000 para el anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con la enzima fosfatasa alcalina, SIGMA; cabra anti-ratón conjugado con la enzima fosfatasa alcalina 1:5.000, Invitrogen; cabra anti-conejo conjugado con la enzima peroxidasa 1:5.000, SIGMA; cabra anti-ratón conjugado con la enzima peroxidasa 1:5.000, AXELL). Tras 1 h de incubación a temperatura ambiente con agitación suave, se lavaron los filtros 3 veces con solución de lavado por 10 min. Para los anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina, luego se realizó un lavado final con el *buffer* de revelado de fosfatasa alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM) por 10 min y se agregaron 5 ml de solución de revelado [10 ml de *buffer* de revelado, 66 µl de Nitro bluetetrazolium (NBT, 50 mg/ml en dimetilformamida 70 %, Promega)] y 33 µl de bromo-cloro-indoil-fosfato (BCIP, 50

mg/ml en dimetilformamida 100 %, Promega). Se incubó con agitación suave por 3 a 15 min con luz tenue, hasta visualizar las bandas de interés. La reacción de revelado se detuvo por lavados con agua y los filtros se secaron al aire y se resguardaron de la luz. Para el anticuerpo conjugado a peroxidasa, el revelado se realizó por quimioluminiscencia utilizando el kit comercial *Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate* (ThermoFisherScientific) o el kit comercial *DAB Substrate Kit* (Cell Marque), según el protocolo sugerido por los fabricantes.

Construcción de los BV recombinantes

Todos los baculovirus utilizados en esta tesis fueron obtenidos mediante el sistema Bac-to-Bac® (Invitrogen). Como se mencionó anteriormente, este sistema requiere el clonado de la secuencia de interés en un vector de transferencia compatible con el sistema. En esta tesis se utilizó el plásmido pFastBac-1 para generar los BV que transportan un solo antígeno, y el pFastBacDual para obtener virus que lleven dos antígenos.

Generación de los bácmidos recombinantes por el método Bac-to-Bac

Se transformaron 50 µl de bacterias *E. coli* DH10Bac con aproximadamente 100 ng de cada plásmido de transferencia. La selección de las bacterias que incorporaron el plásmido se realizó en placas LB-agar con los antibióticos kanamicina, tetraciclina y gentamicina en concentraciones finales de 50 µg/ml, 7 µg/ml y 7 µg/ml respectivamente. El evento de transposición fue seleccionado por el color de la colonia (fenotipo blanco), en presencia de IPTG 50 µg/ml y Bluo-gal 40 µg/ml. Se seleccionaron varias colonias blancas que se crecieron en LB líquido en presencia de los tres antibióticos y los bácmidos se extrajeron con el protocolo de minipreparaciones de DNA, teniendo en cuenta que el tamaño del mismo es de aproximadamente 140 kpb. Posteriormente, se confirmó la presencia del *cassette* transpuesto en el bácmido recombinante mediante PCR con los oligonucleótidos específicos universales M13 *for* y *rev* que hibridan por fuera de los sitios de transposición, y oligonucleótidos internos que hibridan en secuencias específicas del *cassette*. Una vez

confirmada la identidad de los bácmidos recombinantes, los mismos fueron empleados para transfectar células Sf9.

Obtención de los baculovirus recombinantes

Los baculovirus recombinantes se obtuvieron por transfección con Celfectina (Cellfectin®, Invitrogen). Brevemente, se mezcló 1 µg de DNA de bácmido recombinante diluido en 250 µl de medio de cultivo TNM-FH sin suplementar con 250 µl del mismo medio conteniendo 8 µl de Celfectina. La mezcla se incubó 30 min a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de incubación, se agregaron 500 µl de medio y se agregó esta mezcla sobre monocapas de células Sf9 sembradas en placas de seis pocillos a una densidad de 8×10^5 células/pocillo. Las placas se incubaron por 4 hs a 27 °C, se removió el medio de transfección y se agregaron 3 ml de medio TNM-FH suplementado con SFB y antibiótico-antimicótico. Las células fueron incubadas a 27 °C y observadas al microscopio óptico a partir del tercer día postransfección. Tras 4 a 6 días de incubación se observó el efecto citopático producido. Se colectaron los sobrenadantes en forma estéril, se clarificaron por centrifugación a 1.000 x g a 4 °C y se conservaron a 4 °C al resguardo de la luz hasta su uso.

Amplificación de los baculovirus recombinantes

Para aumentar el título viral se realizaron dos o tres pasajes por células Sf9 crecidas en monocapa. Brevemente, se infectaron 1×10^5 células Sf9 por cm² utilizando una moi de entre 0,01 y 0,1. El inóculo viral fue preparado en TNM-FH sin suplementar. Luego de 1 h de adsorción a 27 °C se retiró el inóculo y se agregó medio de cultivo suplementado con suero y antibiótico-antimicótico considerando en todos los casos que 4 ml de medio permiten cubrir 25 cm². Las células se incubaron en estufa a 27 °C por 3 a 4 días. Los sobrenadantes se colectaron de forma estéril, se clarificaron por centrifugación a 1.000 x g a 4 °C y se mantuvieron refrigerados protegidos de la luz.

Titulación viral por dilución a punto final

La titulación de los baculovirus se realizó mediante el método dilución a punto final utilizando la línea Sf9GFP, una línea Sf9 modificada que posee el gen de GFP bajo

promotor de poliedrina previamente generada en el laboratorio empleando la estrategia utilizada por Hopkins [66]. Brevemente, se agregaron 100 µl de diluciones desde 10^{-3} a 10^{-8} de los *stocks* virales realizadas en medio sin suplementar a 900 µl de células Sf9 a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/ml de medio suplementado. 100 µl de cada una de estas suspensiones fueron sembrados en 8 pocillos de una placa de 96 pocillos. Como control negativo se sembraron células mezcladas con 100µl de medio. La placa se incubó por 5 a 7 días en cámara húmeda a 27 °C y se contaron pocillos infectados por visualización al microscopio en presencia de luz azul. El título viral se calculó según lo descripto originalmente por Reed y Muench en 1938 [67].

Protocolos generales de trabajo con modelos murinos

El cuidado y mantenimiento de los animales se realizó en el Bioterio del Instituto de Biotecnología del CICVyA – INTA, Castelar. Los experimentos de desafío con FMDV se realizaron en el laboratorio de bioseguridad NBS-3A OIE del Instituto de Virología de INTA, Castelar. Todos los procedimientos se realizaron respetando las normas internacionales vigentes y contaron con el aval del CICUAE (Comité Institucional para el cuidado y uso de animales de experimentación) del CICVyA.

Inmunización

Los animales fueron inmunizados utilizando diferentes vías según el tipo de experimento, la formulación y el volumen a inocular. Todos los inmunógenos utilizados fueron producidos utilizando materiales libres de endotoxinas. Típicamente, se inyectaron entre 50 y 100 µl por vía i.m., entre 100 y 200 µl por vía i.v. seno retro-orbital o entre 500 y 1000 µl vía i.p. Todos los inmunógenos formulados con adyuvantes fueron administrados por vía i.p.

Obtención de plasma

Las muestras de plasma se obtuvieron por centrifugación a $1.500 \times g$ por 10min de muestras de sangre colectadas en tubos que contenían heparina. Las mismas fueron conservadas a -20 °C hasta su uso.

CAPÍTULO I

*ESTUDIO DE LA DEPENDENCIA ENTRE LA
LOCALIZACIÓN DEL ANTIGENO
VECTORIZADO Y LA RESPUESTA INMUNE
ADAPTATIVA GENERADA*

Introducción

Como fue descripto previamente, el sistema baculovirus-células de insecto fue ampliamente utilizado para la producción de inmunógenos complejos, con requerimientos especiales de plegamiento y procesamiento postranscripcional incompatibles con su producción en otros sistemas, y para la obtención de *VLPs*. Incluso, existen hoy en el mercado algunas vacunas de uso veterinario o humano (Tabla I1)

Tabla I1: Vacunas aprobadas producidas en el sistema BV para uso veterinario o humano

Patógeno o enfermedad	Antígeno	Nombre comercial	Empresa
<i>Para uso veterinario</i>			
Classic swine fever virus	E2	Bayovac CSF E2 TM	Bayer AG
Classic swine fever virus	E2	Porcilis [®] Pesti	Merck
Porcine circovirus type 2	Cap	Porcilis [®] PCV	Merck
Porcine circovirus type 2	Cap	Ingelvac CircoFLEX [®]	Boehringer Ingelheim
<i>Para uso humano</i>			
Human papillomavirus	L1	Cervarix [®]	GlaxoSmithKline
Immunotherapy of human prostate cancer	Prostatic acid phosphatase-GM-CSF fusion protein	Provenge [®]	Dendreon
Influenza virus subtypes A and B	Hemagglutinin	FluBlok TM	Protein Sciences Corporation

Adaptado de Lin 2014 [68].

Si bien es indudable la potencialidad de este sistema como plataforma de producción, los baculovirus han demostrado tener muchas propiedades intrínsecas que los hacen, como vectores vacunales, candidatos aún más prometedores.

A finales de los años 1970 y mediados de 1980, se demostró la capacidad de los baculovirus brotados de *AcMNPV* de ingresar en células de mamífero [69], [70]. Esta entrada involucra a la proteína de superficie GP64 y se sugiere que depende de varias interacciones, entre ellas las mediadas por el heparán sulfato, presente en la matriz extracelular de los tejidos animales. También se proponen la endocitosis mediada por clatrina, la macropinocitosis [71] y la fagocitosis [72] como posibles vías de entrada en células de mamífero, aunque recientemente se confirmó que la endocitosis mediada por clatrina parece ser el mecanismo principal. Una vez dentro de la célula, la nucleocápside viral escapa del endosoma mediante la fusión de la envoltura viral con la membrana de dicho compartimento, proceso mediado por GP64 y disparado por la acidificación, de manera similar a la que ocurre en las células de insecto [73], [74]. La nucleocápside puede entonces eventualmente transportarse al núcleo utilizando proteínas del citoesqueleto [75]. Este transporte involucra filamentos de actina, aunque vimentina, un componente principal de los filamentos intermedios de tipo III, también parece estar implicada.

Como mencionamos anteriormente, la inoculación del baculovirus *AcMNPV* en ratones y su transducción en células de mamífero es capaz de desencadenar respuestas inmunes innatas, que se manifiestan por medio de la secreción de citoquinas (por ejemplo, IL-12, IL-6, TNF- α) e IFN de tipo I [42], [76]–[78]. Fue demostrado que estas respuestas pueden ser generadas tanto por vías dependientes como independientes de TLR-9 [77], por ejemplo, mediante la activación de la vía del TLR-3 [79] o la interacción con detectores de DNA citosólico. Dicha respuesta innata generada por los BV puede atenuar la expresión de un transgen en células somáticas [80].

La administración *in vivo* de baculovirus puede activar macrófagos, células dendríticas y células NK, y las respuestas innatas inducidas por estos vectores son capaces de potenciar la eficacia de una vacuna [71], [76], [81], [82]. Por otro lado, mediante ingeniería genética se han desarrollado diferentes estrategias de presentación de antígenos heterólogos que permiten por un lado la expresión del antígeno dentro de la célula de mamífero o la generación de baculovirus quiméricos para diferentes proteínas estructurales, obteniendo así

viriones que transportan las proteínas de interés como proteínas estructurales del virión brotado. Estos atributos han propiciado su uso no sólo como adyuvante de la vacuna [83]–[86], sino también como vector vacunal en sí mismo.

Dado que los baculovirus pueden transducir un amplio espectro de células animales de diferentes especies [87]–[89], ha sido posible desarrollar y evaluar varios vectores baculovirales recombinantes expresando diferentes antígenos como vacunas de nueva generación. Adicionalmente, esta eficiencia de transducción puede aumentarse mediante el pseudotipado de los baculovirus con la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV) expresada en las células de insecto e incorporada pasivamente a la envoltura del baculovirus. Este tipo de estrategia resultó más eficiente comparada a la inmunización con sus contrapartes de vacunas a DNA debido tanto a la mayor eficiencia de transducción de estos baculovirus pseudotipados como a las mencionadas propiedades adyuvantes de los mismos. Además de la proteína G de VSV, es posible utilizar otras proteínas de superficie como las derivadas de retrovirus endógenos humanos (HERV), con las que se desarrollaron vacunas experimentales bivalentes contra los HPV 16 y 18 [90] o trivalentes 16/18/58 [91].

Existen actualmente tres estrategias principales de *display* en baculovirus. La primera y más utilizada consiste en la fusión N-terminal del polipéptido de interés a una segunda copia de la proteína mayoritaria de envoltura, Gp64 (Fig. I7, panel A). Dado que fue demostrado que sólo el péptido señal y los dominios de multimerización, transmembrana y citosólico son suficientes, el reemplazo del fragmento no esencial permitió expresar polipéptidos de tamaño molecular superior. Existen algunos ejemplos de esta estrategia empleando antígenos derivados de parásitos, bacterias y virus, que presentaron un éxito relativo como inmunógenos experimentales. En particular, nuestro grupo fue pionero en el empleo de esta metodología para el desarrollo de vacunas experimentales contra la fiebre aftosa [19], [20] y el herpesvirus bovino tipo I [92]. Estos ejemplos muestran la capacidad de los BV de tolerar la fusión de proteínas de gran tamaño en una segunda copia de GP64 sin afectar su viabilidad. A pesar de la plasticidad de esta estrategia, la presencia de la proteína quimérica se restringe a un polo del virión brotado y su densidad es relativamente

baja. En cambio, la distribución no polar alcanzada siguiendo otra estrategia de direccionamiento al virión permitió alcanzar densidades mucho mayores de una proteína reportera [93]. Este sistema de presentación en superficie mejorado se basa en la fusión de la secuencia de interés al dominio transmembrana y citosólico (TD/CTD) de la proteína G del virus de la estomatitis vesicular, G-VSV (Fig. I7, panel C). Ambas estrategias de presentación en la superficie del virión permiten el reconocimiento directo del antígeno a través de los receptores de los linfocitos B: las inmunoglobulinas de superficie. La presentación de manera repetida aumenta la probabilidad de entrecruzamiento de estos receptores, bajando así la intensidad de la segunda señal necesaria para su activación y proliferación por parte de los linfocitos T colaboradores.

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, el descubrimiento de la capacidad de transducción de los BV impulsó su implementación como vector para dirigir la síntesis de *novos* de antígenos empleando promotores adecuados. En este caso, la estrategia original que empleaba el promotor CMV para dirigir la expresión del gen y la envoltura original del BV como mediadora de la entrada del virión en la célula, también fue mejorada. Shoji y colaboradores demostraron la superioridad del *cassette* CAG (constituído por un promotor híbrido formado por enhancer de CMV y el promotor del gen β -actina de pollo, y la señal de poliadenilación de gen β -globina de conejo) obteniendo 10 veces más actividad del gen reportero en comparación con la actividad ya reportada para CMV [94]. Como se mencionó, la eficiencia de transducción y el tropismo de los BV pueden ser modificados agregando proteínas a la envoltura viral. Los BV pseudotipados con la proteína G de VSV que dirigen la expresión de numerosos antígenos vacunales tales como la proteína HA del virus de la gripe aviar H5N1 [95] y la proteína G del virus de la rabia [96] han probado ser eficientes vectores vacunales. De hecho, como antígenos traducidos por la maquinaria celular, estos polipéptidos pueden procesarse en el citoplasma de las células presentadoras de antígeno y, a su vez, los péptidos procesados pueden cargarse en moléculas de CMH-I para provocar respuestas inmunes citotóxicas dirigidas a células que expresan antígeno, de manera similar a como lo hacen las vacunas de DNA [34]. Sin embargo, la baja o nula efectividad de esta estrategia para generar respuestas protectoras para otros antígenos

requirió la combinación con la presentación en superficie. Los vectores duales pueden generarse mediante la construcción de dos *cassettes* de expresión independientes, o puede insertarse el antígeno bajo una secuencia que incluya tanto a un promotor activo en células de mamífero como a un promotor fuerte del sistema baculovirus. Por ejemplo, una construcción codificante para antígenos de malaria dirigidos por el promotor híbrido CMV/polh permitió la expresión en células de insecto infectadas y en células de mamífero transducidas. La vacunación de animales con el baculovirus dual indujo un perfil combinado Th1 y Th2 y proporcionó protección contra malaria [97]–[99]. Dicho promotor doble también se ha utilizado para presentar y expresar la proteína HA del virus H9N2 [100], la proteína Cap del PCV2 [101] y la proteína S del virus de la bronquitis infecciosa [102]. Recientemente, Iyori del laboratorio de Yoshida utilizaron un promotor CAG/polh y la proteína de circumsporozoíto de *P. falciparum* (PfCSP) como antígeno heterólogo [103]. La inmunización de ratones con dicho BV indujo respuestas inmunitarias Th1 / Th2 mixtas, con la generación de altos títulos de anticuerpos específicos proporcionando una protección significativa contra el desafío. Finalmente, Kukkonen y colaboradores reportaron por primera vez el *display* en la cápside con el fin de diseñar una herramienta para realizar el seguimiento de los BV intracelularmente *in vitro* y su distribución dentro de los tejidos de mamíferos *in vivo*, a la vez de sentar las bases para mejorar la capacidad de nucleocápsides de alcanzar el núcleo de células de mamíferos. Para esto, diseñaron un baculovirus recombinante que portaba la proteína GFP como fusión a la proteína mayoritaria de cápside, VP39. Esta herramienta posibilitó estudiar la presencia de la cápside viral dentro de las células de mamífero, ya que los BV al escapar del endosoma conservan GFP [104]. La aplicación de esta estrategia permitió, adicionalmente, contrastar la hipótesis de que los polipéptidos que alcanzan el citoplasma de células dendríticas pueden ser procesados en el proteasoma y los péptidos de degradación derivados pueden ser cargados en moléculas del CMH de manera de despertar respuestas citotóxicas mediante presentación cruzada. Así, nuestro grupo probó por primera vez que baculovirus que transportaban un fragmento del polipéptido OVA en su cápside interna como fusión a la proteína VP39 (Fig. I7, panel D) tienen la capacidad de actuar como adyuvante y vector en ratones, logrando la maduración

in vivo de las células dendríticas y la producción de citoquinas inflamatorias, promoviendo respuestas CD4 específicas y CD8 citotóxicas contra OVA. Esta respuesta fue lo suficiente fuerte como para rechazar un desafío con células de melanoma murino que expresan OVA y prolongar la supervivencia de ratones tratados terapéuticamente [104].

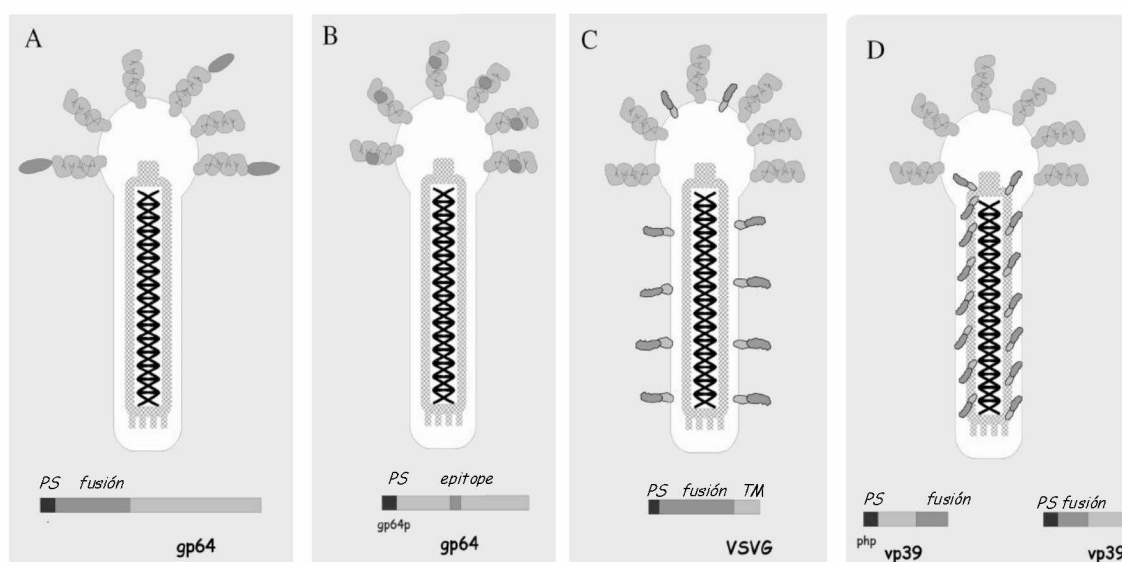


Figura I7. Representación de las estrategias de *display* en BV. (A) Proteína de interés fusionada al extremo amino de una segunda copia de GP64 bajo el promotor de poliedrina. (B) Inserción de péptidos de interés dentro de la copia original de GP64 quedando bajo el promotor de gp64. (C) Proteína de interés fusionada a la proteína G de VSVG bajo el promotor de poliedrina. (D) Proteína de interés fusionada a la proteína de la cápside VP39 tanto en su extremo amino como carboxilo bajo el promotor de poliedrina. TM: región transmembrana, PS: péptido señal. Modificado de Oker-Blom (2003) [105].

Los resultados expuestos por los diferentes grupos de investigación que emplearon numerosos antígenos específicos y diversas estrategias, resultan prometedores y revelan la versatilidad de los BV como vectores vacunales. Sin embargo, resulta difícil dilucidar el aporte de cada una de las estrategias en términos de la potencia y calidad de las respuestas en base a las diferentes publicaciones individuales.

Así, en este trabajo nos propusimos en primer lugar comparar el efecto de la localización de un único antígeno modelo en diferentes posiciones de la partícula viral y comparar la inmunogenicidad de las estrategias de transporte o transducción en un ensayo unificado.

Objetivos específicos

Construir y caracterizar los baculovirus recombinantes BV-OVAsd, BV-OVAcd y BV-OVAcag, que transportan o codifican como antígeno modelo un fragmento de la proteína ovoalbúmina que comprende los sitios antigénicos OVA₂₅₇₋₂₆₄ que se asocia al CMH-I (epitope CD8, SIINFEKL) y OVA₃₂₃₋₃₃₉ que se asocia al CMH-II (epitope CD4, ISQAVHAAHAEINEAGR), de manera de evaluar *vis a vis* la influencia de la localización del antígeno en la partícula viral y la estrategia de presentación antigénica en el tipo e intensidad de la respuesta inmune obtenida en el modelo murino.

Materiales y Métodos

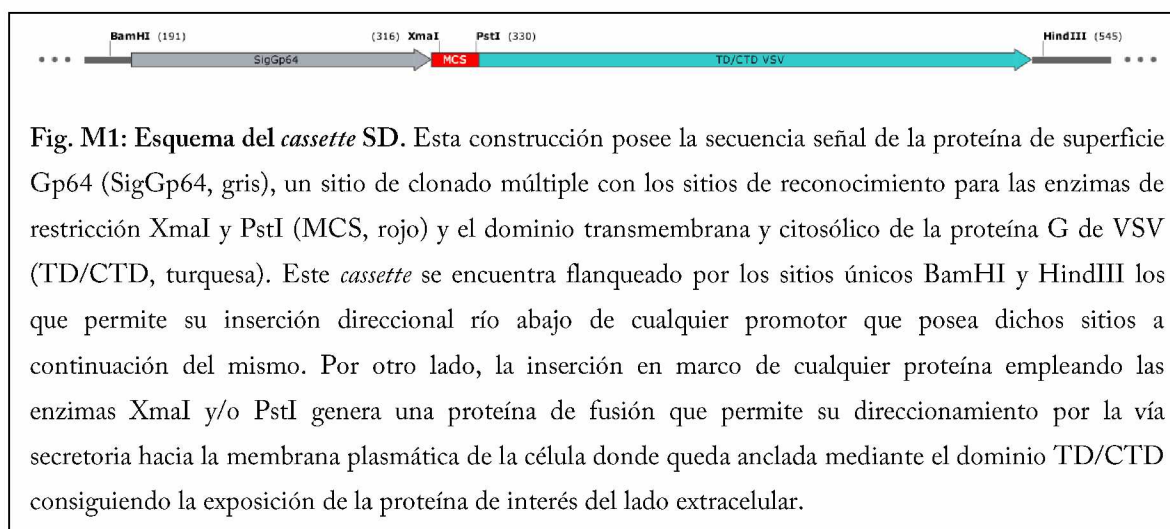
Producción y caracterización de los baculovirus recombinantes BV-OVA

Selección del antígeno modelo

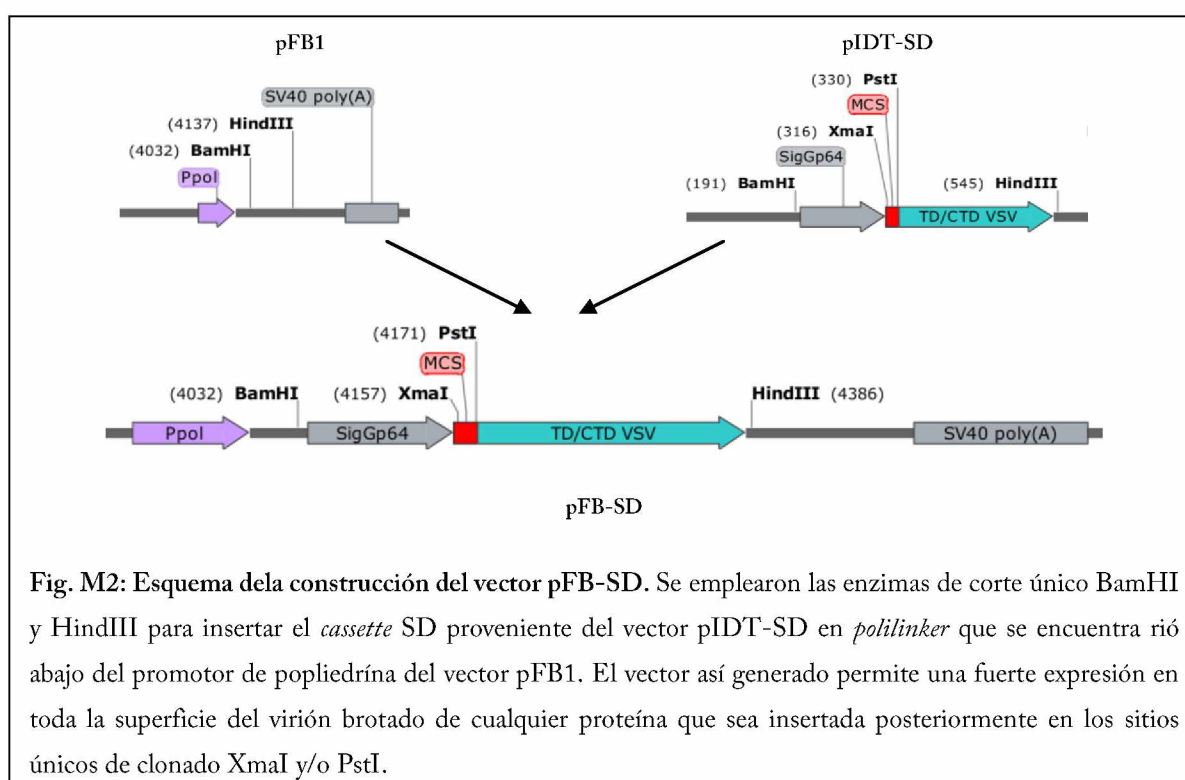
En este trabajo se utilizó como antígeno modelo un fragmento de la proteína albúmina de pollo (OVA, aa 197- 386), el cual contiene los epitopes CD4⁺ (OVA₃₂₄₋₃₄₀, ISQAVHAAHAEINEAGR) y CD8⁺ (OVA₂₅₈₋₂₆₅, SIINFELK). Como se mencionó previamente, esta proteína es ampliamente utilizada por diversos grupos de investigación, ya que se cuenta con el conocimiento acabado de las secuencias de péptidos capaces de cargarse en moléculas del CMH-I y -II murinos y con las herramientas necesarias para evaluar la respuesta celular citotóxica y la respuesta humoral.

Construcción de los vectores de transferencia pFB-OVA

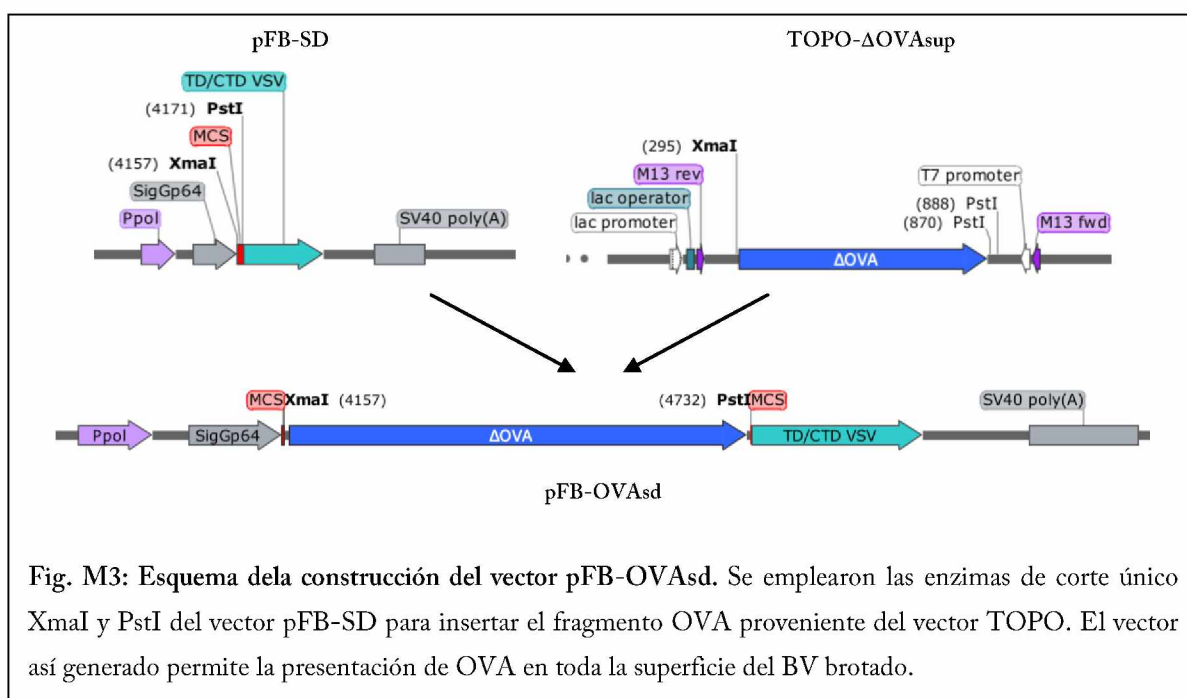
Para la obtención del BV transportando OVA en la superficie (BV-OVAsd), en primer lugar se generó el vector pFB-SD. Dicho vector contiene bajo el promotor de poliedrina la secuencia codificante para el péptido señal de GP64 (aa 1 – 38, GenBank: AAA72759.1), un sitio de clonado múltiple y la secuencia que codifica para el dominio transmembrana y el dominio citoplasmático (TD/CTD) de la proteína G de VSV (aa 442–511, GenBank: KU534946.1). Para su construcción se solicitó la síntesis química (IDT – Biodynamics) de la secuencia nucleotídica denominada SD (SigGp64-MCS-GVSV) y clonado en un plásmido con resistencia a kanamicina para su selección en bacterias, denominado pIDT-SD. El plásmido contiene además el sitio de reconocimiento para la enzima BamHI en el extremo 5' de SD y el sitio para HindIII en el extremo 3'. Además, se consideraron las secuencias consenso que rodean el ATG para una óptima traducción en el sistema baculovirus/células de insecto (ANYATGNY). La figura M1 muestra un esquema de la construcción. La secuencia completa se encuentra en los anexos.



Una vez obtenidas las preparaciones de alta calidad de DNA de los vectores pFB1 y el vector comercial que contiene la secuencia SD, ambos fueron digeridos usando las enzimas BamHI y HindIII, resueltos en gel de agarosa y las bandas correspondientes al vector e inserto fueron purificadas y ligadas. Se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α y la selección se realizó en placas LB-agar-Gentamicina. Los clones obtenidos se caracterizaron por digestión con enzimas de restricción. La figura M2 esquematiza la construcción. El mapa completo del vector se encuentra en los anexos.



Por otro lado, el fragmento de OVA (aa 198–379, GenBank: AH002466.2) se obtuvo de un vector TOPO previamente construido en el laboratorio (tesis de Maria Paula Molinari, Facultad de Ciencias exactas y Naturales – UBA, 2009). Dicho vector (llamado TOPO- Δ OVA^{sup}) y el vector pFB-SD fueron digeridos utilizando las enzimas XmaI y PstI, resueltos en gel de agarosa y las bandas correspondientes al vector e inserto fueron purificadas y ligadas en presencia de la enzima T4 DNA ligasa. Se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α y la selección se realizó en placas LB-agar-Gentamicina. Los clones obtenidos se caracterizaron por digestión con enzimas de restricción. La figura M3 esquematiza la construcción del vector resultante denominado pFB-OVA^{sd}. El mapa completo se encuentra en los anexos.



Como se mencionó previamente, el laboratorio ya disponía del BV transportando OVA en la cápside [104]. La figura M4 muestra un esquema del *cassette* que permite la expresión de una copia extra de VP39 fusionada a la proteína OVA. El mapa completo del vector pFB-OVA^{sd} se encuentra en los anexos.



Fig. M4: Esquema del *cassette* OVAc. Esta construcción posee la secuencia de OVA fusionada al extremo N-terminal de una segunda copia de la proteína mayoritaria de cápside, VP39. Dicha fusión se encuentra río abajo del promotor de poliedrina y permite la generación de nucleocápsides quiméricas.

Finalmente, para la obtención del BV con la capacidad de transducir el mismo fragmento de la proteína OVA en células de mamífero, en primer lugar se realizó el reemplazo de la secuencia de GFP en el vector pCX-EGFP por la secuencia de OVA. Para ello se amplificó por PCR de alta fidelidad la secuencia OVA desde el vector TOPO-ΔOVAsup utilizando oligonucleótidos que permitieran incorporar el atg y la secuencia Kozac (5')ACCAUGG(3') (oligonucleótido OVAcag *for*) y los sitios de restricción necesarios (EcoRI, ambos oligonucleótidos).

OVAcag *for*: AAGAATTTCGCCACCATGGCGTTCAGAGTGACT

OVAcag *rev*: AAGAATTCTTAGGAAACACATCTGCC

La figura a continuación esquematiza la hibridación de los oligonucleótidos en el vector de partida.

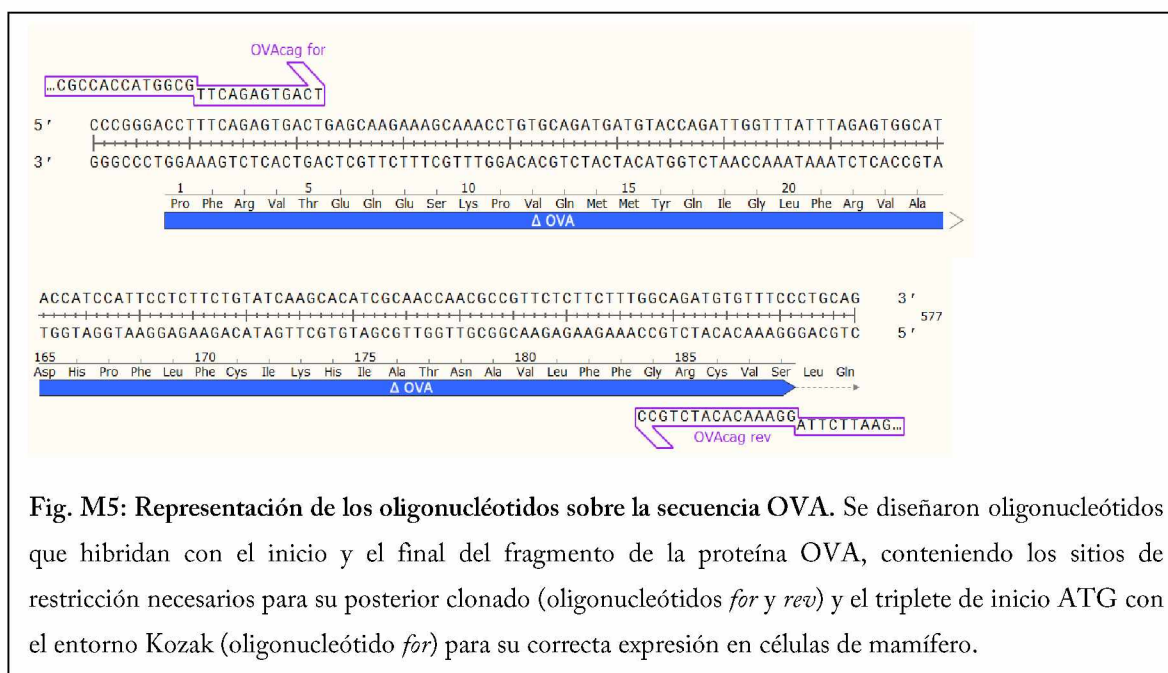
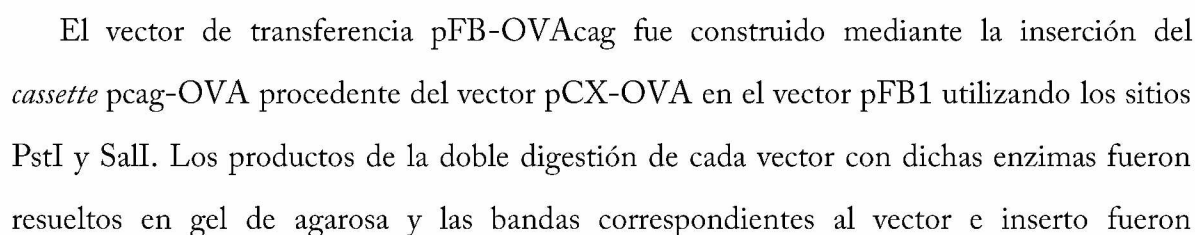


Fig. M5: Representación de los oligonucleótidos sobre la secuencia OVA. Se diseñaron oligonucleótidos que hibridan con el inicio y el final del fragmento de la proteína OVA, conteniendo los sitios de restricción necesarios para su posterior clonado (oligonucleótidos *for* y *rev*) y el triplete de inicio ATG con el entorno Kozak (oligonucleótido *for*) para su correcta expresión en células de mamífero.



purificadas y ligadas. Se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α y la selección se realizó en placas LB-agar-Gentamicina. Los clones obtenidos se caracterizaron por digestión con enzimas de restricción. La figura M7 muestra un esquema de la construcción. El mapa completo del vector pFB-OVAcag se encuentra en los anexos.

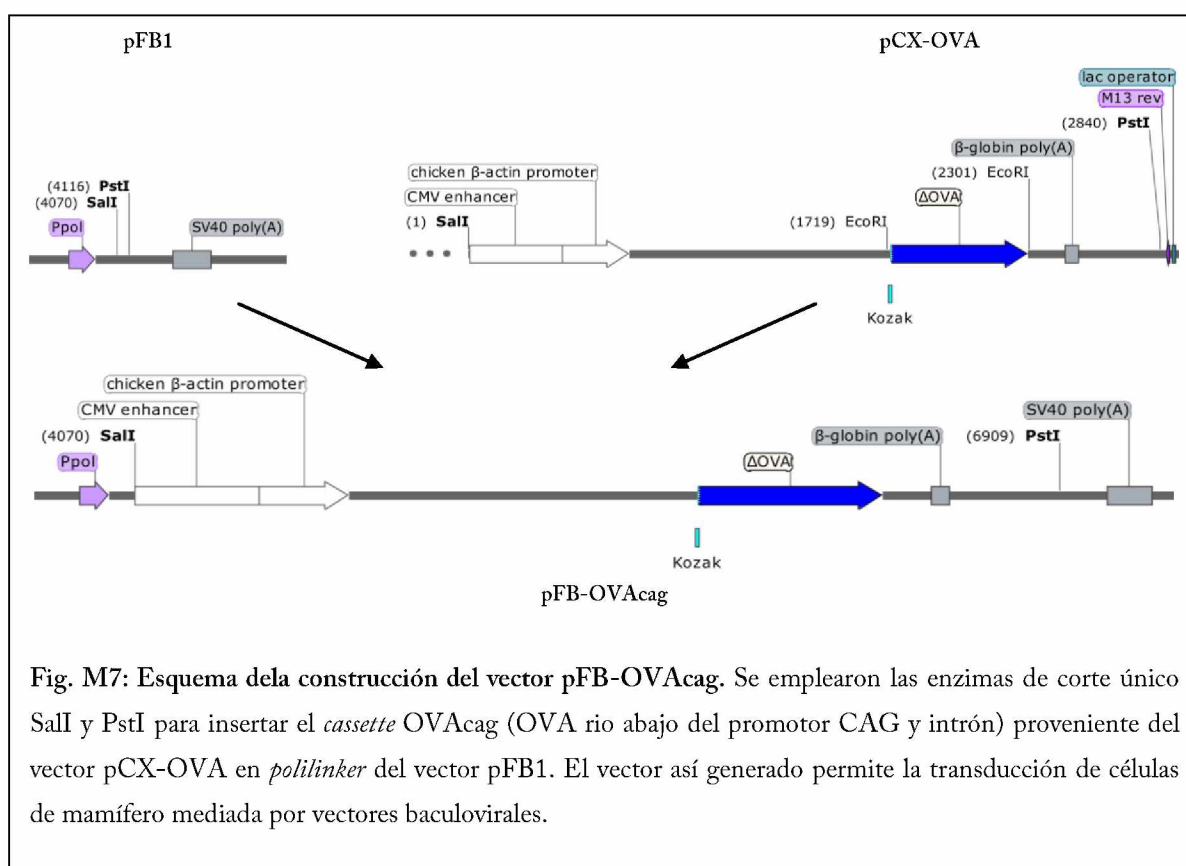


Fig. M7: Esquema de la construcción del vector pFB-OVAcag. Se emplearon las enzimas de corte único SalI y PstI para insertar el *cassette* OVAcag (OVA río abajo del promotor CAG y intrón) proveniente del vector pCX-OVA en *polilinker* del vector pFB1. El vector así generado permite la transducción de células de mamífero mediada por vectores baculovirales.

Caracterización de los baculovirus recombinantes BV-OVA por inmunomicroscopía de fluorescencia

La obtención de los bácmidos mediante el sistema Bac-to-Bac y la generación de *stocks* virales se realizaron siguiendo el procedimiento descrito en materiales y métodos generales.

Para evaluar la expresión y localización celular del antígeno modelo en las diferentes construcciones se realizaron inmunomicroscopías de fluorescencia de células Sf9 infectadas con BV-OVAsd o BV-OVAc, y de células BHK-21 transducidas con el BV-OVAcag. En todos los casos, las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos.

Fue necesario un tratamiento previo con polilisina comercial (Poly-L-lysine, SIGMA) para asegurar la adhesión de la línea celular Sf9 a los cubreobjetos. Se utilizaron 3×10^5 células por pocillo y una moi aproximada de 10 en las infecciones de células Sf9 y 100 en las transducciones de BHK-21. Las infecciones en Sf9 se realizaron utilizando el protocolo ya descrito, utilizando un volumen de infección de 300 μ l. Las células se mantuvieron en estufa a 27 °C. Para realizar las transfecciones se utilizó BV-OVAcag concentrado por centrifugación, resuspendido en 200 μ l de PBS pH 6,2 y diluido por agregado de 800 μ l de PBS pH 7. Se utilizaron 300 μ l de virus concentrado por pocillo. El virus se incubó con las células BHK-21 a 27 °C por 2 hs. Finalizada la incubación se retiró el inóculo y se agregó medio D-MEM 2 % SFB. Las células fueron cultivadas en estufa a 37 °C y CO₂ 5 %.

En todos los casos, a las 48 hs pos tratamiento con virus las células fueron lavadas con PBS (se utilizó PBS pH 6,2 para células de insecto y pH 7 para células de mamífero) y fijadas durante 10 min a 4 °C utilizando una solución de paraformaldehído (SIGMA) 2% en PBS. A continuación se retiró la solución de fijado y las células fueron lavadas 3 veces con una solución de Glicina (Applichem) 0,2 M en PBS y 2 veces con PBS. Las células tratadas con BV-OVAcid y BV-OVAcag fueron permeabilizadas y bloqueadas por incubación a TA con PBS-BSA-Saponina (BSA 0,2%, Saponina 0,05% -MP Biomedicals) durante 20 min. La marcación con el anticuerpo primario se realizó ON a 4 °C utilizando un suero policlonal anti-OVA diluido 1:250 en PBS-BSA-Saponina. A continuación se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS-BSA-Saponina y se incubó con una dilución 1:1.000 del anticuerpo secundario anti-conejo conjugado al fluoróforo Alexa 546 (Invitrogen) durante 1 h a TA. Finalmente, se realizaron 3 lavados, un lavado con agua destilada, se dejó secar y los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos utilizando Mowiol.

En el tratamiento de las células infectadas con BV-OVAsd no se realizó el paso de permeabilización y no se utilizó saponina en las soluciones.

Las imágenes fluorescentes se obtuvieron con un microscopio Leica TCS SP5 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) con un aumento de 63X (1.2 AN) o 40X (1.25 AN).

Caracterización de los BV-OVA por *Western blot*

Para evaluar si los viriones brotados efectivamente incorporaron el antígeno heterólogo a su estructura, se concentraron muestras de 2 ml de segundos pasajes de las diferentes construcciones por centrifugación a 80.000 x g a 4 °C durante 1 h y se resuspendieron en 20 µl de *cracking buffer* 1X (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, glicerol 10 %, SDS 2 %, 2-mercaptoetanol 100 mM, azul de bromofenol 0,025 %). Las muestras se hirvieron por 10 min, se resolvieron por SDS-PAGE y se analizaron por *Western blot*.

La confirmación de la localización del antígeno en la partícula viral se realizó adicionalmente por *Western blot* utilizando muestras pretratadas con un *buffer* que permite disolver la membrana del virión brotado manteniendo la estructura de las nucleocápsides. Para esto, se concentraron por centrifugación dos muestras de cada virus, que fueron luego resuspendidas en 300 µl de *buffer* de lisis (NaCl 150 mM, Tris pH 8.0 50 mM, Tritón X-100 1%) o 300 µl de la misma solución sin Tritón. Tras una incubación de 1 h a TA, las muestras fueron nuevamente concentradas por centrifugación, resueltas por SDS-PAGE y analizadas por *Western blot*.

Determinación de la respuesta celular citotóxica específica para OVA

Para estos experimentos se utilizaron ratones hembra C57BL/6J de 6 a 8 semanas de edad al inicio del experimento. La inmunización se realizó por la vía i.v. en el seno retro-orbital utilizando agujas 27 G. La dosis fue de 5×10^7 ufp y el volumen inoculado nunca superó los 200 µl. Los inmunógenos a ensayar fueron *stocks* virales titulados y caracterizados por *Western blot* (BV-OVAsd, BV-OVAcd, BV-Wt) o inmunomicroscopía de fluorescencia (BV-OVAcag).

Experimentos de citotoxicidad *in vivo* en el modelo ratón

Se inmunizaron grupos de 4 ratones con las formulaciones vacunales a evaluar. Siete días post vacunación, se sacrificó un ratón sin inmunizar por cada dos ratones inmunizados para obtener esplenocitos *naïve*. Para ello se extrajeron los bazo de ratones y se disgregaron mecánicamente utilizando portaobjetos esmerilados y medio de cultivo RPMI (Gibco) sin

suplementar en baño de hielo. Las células fueron centrifugadas a 500 x g durante 5 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se removieron los glóbulos rojos por lisis osmótica con 500 µl de *buffer* de lisis (cloruro de amonio 8,3 g/l - SIGMA) por bazo durante 2 min a TA. Finalizado el tiempo de incubación, se agregaron 4 ml de medio de cultivo por bazo y las células fueron centrifugadas y resuspendidas nuevamente en RPMI. La suspensión celular fue dividida en partes iguales y a una de ellas se le agregó el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ a una concentración de 10 µg/ml. Ambas suspensiones fueron incubadas en estufa a 37 °C y CO₂ 5 % durante 20 min con agitación suave ocasional. A continuación se realizaron dos lavados con PBS utilizando 3ml de PBS por bazo. Al finalizar el segundo lavado, se realizó el recuento de las células viables con una solución de azul de Trypan 0,4 % y el volumen fue corregido para disponer de suspensiones de aproximadamente 1×10^7 células/ml. Por otro lado, se prepararon dos soluciones de CFSE (del inglés, *Carboxy Fluorescein Succinimidyl Ester* – Invitrogen). El volumen de PBS utilizado fue igual al volumen de las suspensiones, y las concentraciones fueron de 6 µM (alto) y 0,6 µM (bajo). Los esplenocitos cargados con OVA se mezclaron con la solución de CFSE de alta concentración y los esplenocitos sin cargar con la solución de CFSE de baja concentración. Ambas suspensiones se incubaron a TA en oscuridad por 5 min, se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron a 1×10^8 células/ml. Las suspensiones fueron mezcladas en un único tubo y se inyectaron 200 µl de la mezcla por vía i.v. (seno retro-orbital) a cada ratón que había sido inmunizado al día 0. A las 20 hs se sacrificaron los animales, se aislaron los esplenocitos como se describió previamente, pero en este caso se utilizó RPMI suplementado con L-glutamina 2 mM (Gibco), antibiótico-antimicótico (Gibco), 2-β-mercaptoetanol 50 µM, y SFB 10 % (Natocor). Una muestra de suspensión de esplenocitos de cada ratón se lavó dos veces con PBS y se analizaron 5×10^6 células por citometría de flujo. Se calculó el porcentaje de lisis específica como $[1 - (R \text{ animal control} / R \text{ animal experimental})] \times 100$, donde R = % de células CFSE bajo / % de células CFSE alto.

Por otro lado, se realizó el cultivo y reestimulación de los esplenocitos obtenidos.

Cultivo y reestimulación de esplenocitos *in vitro*

Se cultivaron en placas de 96 pocillos fondo en U 1×10^6 esplenocitos por pocillo en presencia de los siguientes reestímulos preparados en medio de cultivo completo: péptido clase I (OVA₂₅₇₋₂₆₄) 1 µg/ml y los agentes inespecíficos PMA 20 ng/ml [12-miristato 13-acetato éster de forbol (SIGMA)] e ionomicina 500 ng/ml (SIGMA) como control de viabilidad. Además de las mencionadas, fueron cultivadas muestras de cada uno de los ratones sin reestímulo específico (mock). Las placas se incubaron en estufa a 37 °C y CO₂ 5 %. A las 72 h, las placas fueron centrifugadas a 500 x g durante 7 min a 4 °C y los sobrenadantes se conservaron a -80 °C hasta realizar la cuantificación de citoquinas.

Cuantificación de IFN- γ en sobrenadante de cultivo de esplenocitos

La cuantificación de INF- γ se realizó por ELISA *sándwich* mediante el kit comercial *Mouse IFN- γ ELISA Set* (BD OptEIA) siguiendo las especificaciones del fabricante. Se utilizaron placas de 96 pocillos fondo plano (H2B Maxisorp, NUNC). Las diluciones de las muestras y la curva estándar fueron preparadas en PBS-SFB. Se realizaron diluciones 1/20 para los sobrenadantes de cultivo con péptido OVA y sin reestimar. Se utilizó la solución de sustrato comercial *TMB Substrate Reagent Set* (BD Pharmingen) y la reacción se detuvo por agregado de H₂SO₄ 2 N. Las placas fueron leídas a 450 nm en un lector de ELISA (Multiskan, Labsystems) y se realizó la correspondiente corrección teniendo en cuenta la absorbancia a 570 nm.

Determinación de la respuesta humoral en el modelo ratón

Para estos experimentos se utilizaron ratones hembra Balb/c de 6 semanas de edad al inicio del experimento. La inmunización se realizó por la vía i.p. utilizando agujas de 25 G. La dosis inoculada fue de 1×10^8 ufp y el volumen nunca superó los 1000 µl. Los inmunógenos a ensayar fueron *stocks* virales titulados y caracterizados por *Western blot* (BV-OVAsd, BV-OVAcd, BV-Wt) o inmunomicroscopía de fluorescencia (BV-OVAcag). Se inocularon 3 dosis, una cada 15 a 18 días. Las muestras de suero fueron tomadas el día anterior a cada inmunización.

Determinación de anticuerpos totales anti OVA

La determinación de anticuerpos totales anti OVA en las muestras de los sueros de ratón fue realizada por ELISA indirecto. Para ello se sensibilizaron a 4 °C durante toda la noche placas de 96 pocillos fondo plano (H2B Maxisorp, NUNC) utilizando 50 µl por pocillo de una solución de OVA (SIGMA) 10µg/ml en *buffer* carbonato/bicarbonato de sodio pH 9,6. Luego de lavar con 300 µl de PBS-T (PBS 1 X, Tween 20 0,05 %) se realizó el bloqueo por agregado de 100 µl de PBS-SNE-Leche (PBS- Suero Normal Equino 5% - Leche 1%) e incubación en cámara húmeda durante 1 h a 37 °C. Finalizado el bloqueo, se lavaron las placas y se agregaron 50 µl por pocillo de diluciones seriadas al medio de *pools* de sueros incógnitas y de los sueros previos a la inmunización, realizadas en PBS-SNE. Cada determinación se realizó por duplicado. Como control positivo se utilizó una dilución 1:3.000 del anticuerpo monoclonal comercial anti-OVA clon 14 (SIGMA). Las placas fueron incubadas en las condiciones descriptas anteriormente y lavadas 3 veces con PBS-T. Como anticuerpo secundario se utilizó una dilución 1:2.500 de un anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con la enzima peroxidasa (AXELL). Finalmente, se realizaron 3 lavados y se utilizó como sustrato 50 µl de la solución comercial *TMB Substrate Reagent Set* (BD Pharmingen). La reacción se detuvo por agregado de 25 µl H₂SO₄ 2 N y las placas fueron leídas a 450 nm. Se determinó como punto de corte el promedio de los sueros tomados antes de la inmunización más dos desvíos estándar ($X_{neg} + 2\sigma$).

Determinación de anticuerpos totales anti BV

La determinación de anticuerpos totales anti BV fue realizada utilizando la misma técnica y protocolo descriptos en el punto anterior con las siguientes modificaciones. Para la sensibilización de las placas se utilizaron BV concentrados por centrifugación a 80.000 x g durante 1 h a 4 °C y resuspendidos en *buffer* carbonato/bicarbonato de sodio a una concentración teórica de 1×10^7 ufp/ml. Como control positivo se utilizó una dilución 1:500 del anticuerpo monoclonal comercial anti-Gp64 clon AcV1 (Santa Cruz).

Determinación del perfil de isotipos

Para determinar el perfil de isotipos de anticuerpos contra OVA y contra BV se utilizaron los anticuerpos de cabra anti IgG1, IgG2a, IgG2b o IgG3 de ratón contenidos en el kit comercial *Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagent* (SIGMA). Las condiciones de sensibilización, bloqueo e incubación, así como las soluciones utilizadas, fueron las descritas previamente para cada ELISA. En este caso, se analizaron diluciones fijas de *pools* de sueros correspondientes al máximo título de anticuerpos totales. También se analizaron sueros preinmunes. Para la determinación de isotipos anti OVA se utilizó una dilución 1:20 y para la determinación de isotipos anti BV, 1:1.000. Luego de la incubación con los sueros, las placas se lavaron y se incubaron con los anticuerpos de cabra anti IgG específica de ratón diluidos 1:1.000. Como anticuerpo de detección se utilizó un anticuerpo comercial bovino anti-cabra conjugado a HRP (Chemicon) en dilución 1:1.000. Cada determinación se realizó por duplicado. Como control positivo se utilizaron los anticuerpos monoclonales comerciales anti-OVA y anti-Gp64.

Resultados

Obtención y caracterización de los BV-OVA

Con el objetivo de comparar *vis a vis* la influencia de la localización antigénica y las diferentes estrategias de presentación antigénica mediadas por baculovirus, se construyeron vectores de transferencia compatibles con el sistema Bac-to-Bac, que permitieron la expresión del antígeno modelo (fragmento de la proteína albúmina de pollo que contiene los epitopes CD4⁺ - ISQAVHAAHAEINEAGR- y CD8⁺ - SIINFEDL) en la estructura del virión brotado (en la envoltura o en la cápside) o que permitieron su transducción en células de mamífero.

Construcción de los vectores pFB-OVA

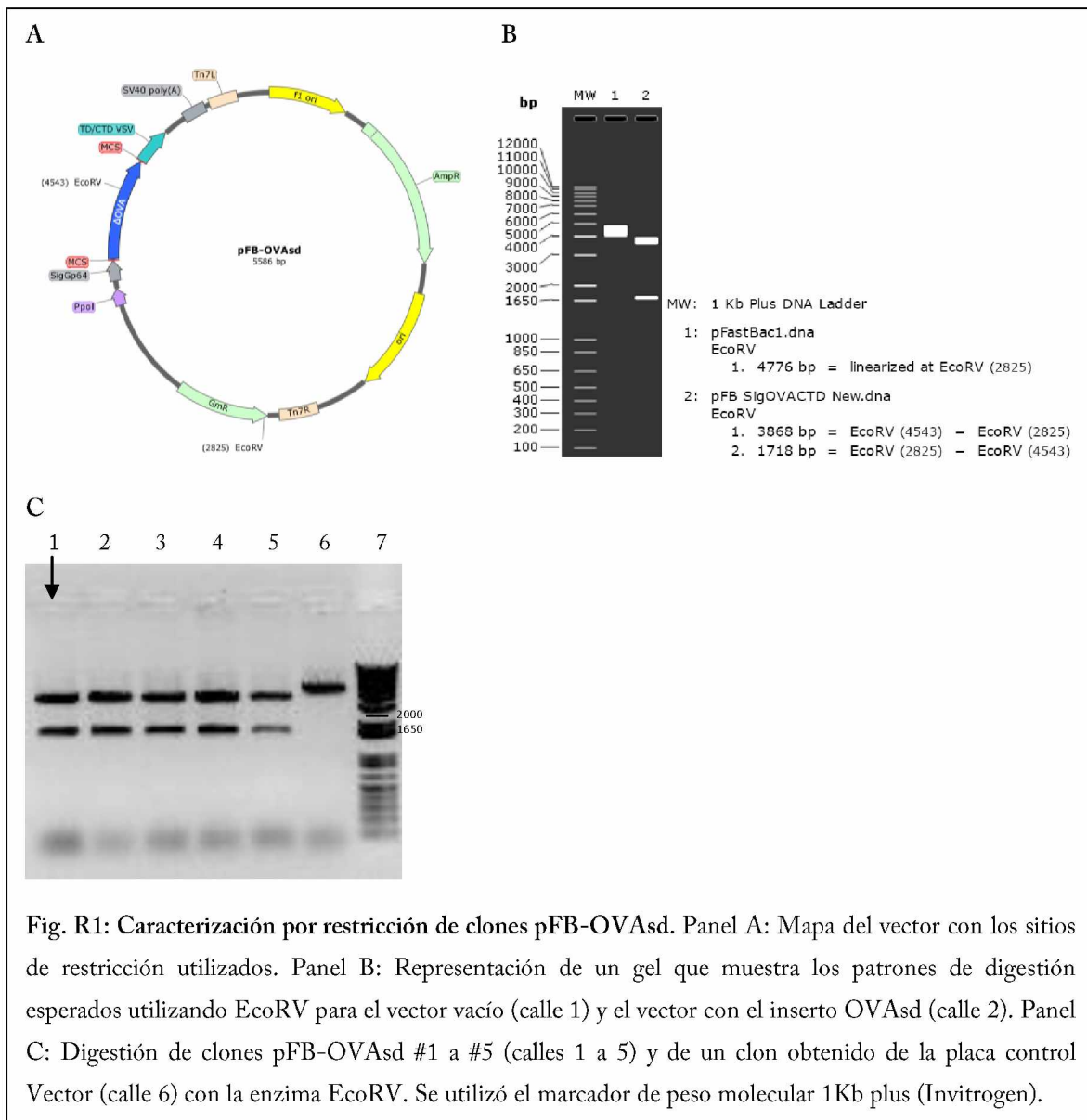
La construcción de dichos vectores se realizó utilizando el vector comercial pFB1, empleando el sitio de clonado múltiple que se encuentra río abajo del promotor tardío de poliedrina. Se construyeron dos vectores de transferencia que permitieron la expresión del antígeno modelo (OVA) utilizando las siguientes estrategias:

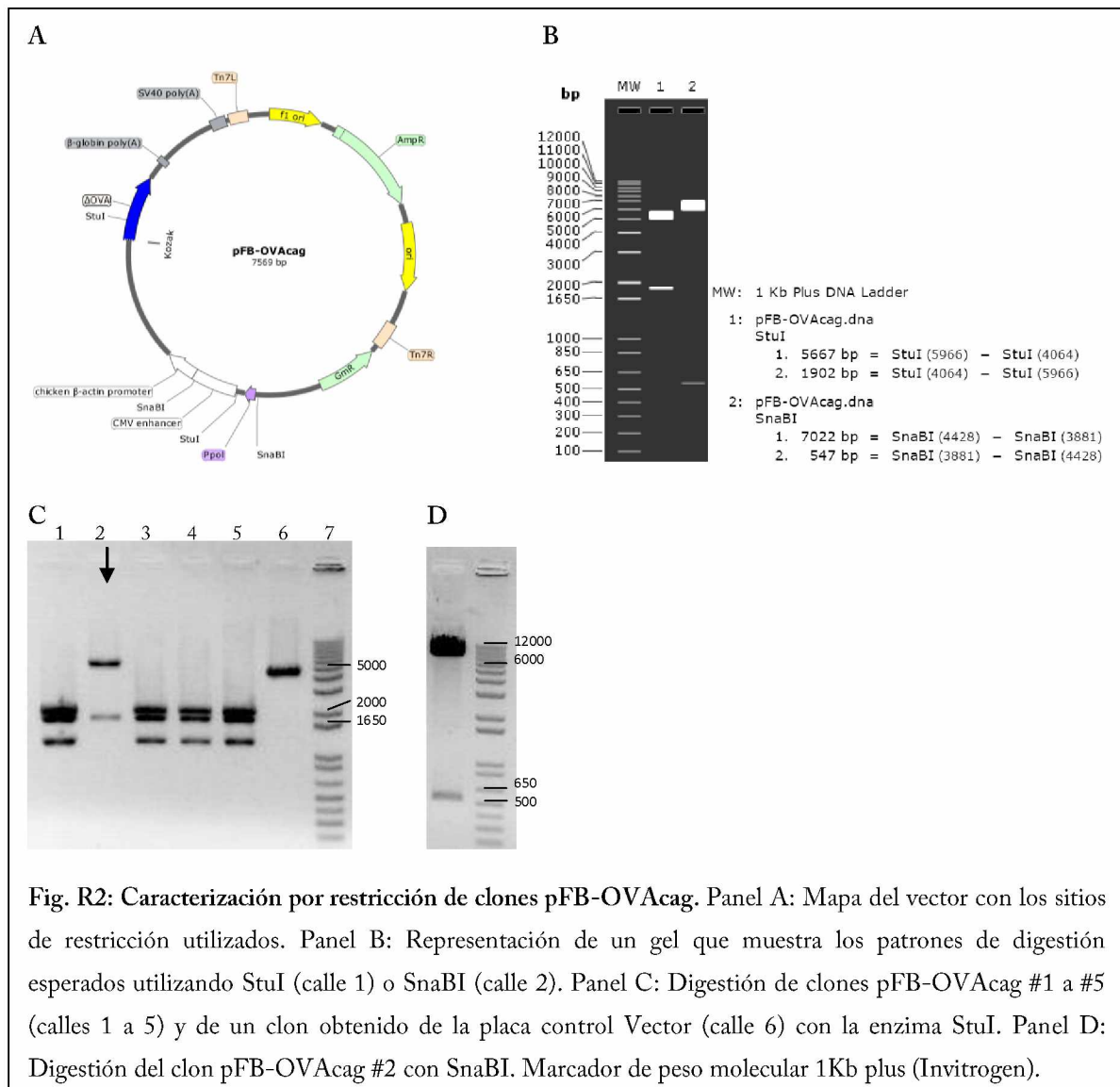
- Fusión al dominio transmembrana y citoplasmático de la proteína G de VSV (pFB-OVAsd), río debajo de la secuencia señal de Gp64. Al brotar a través de la membrana plasmática, el virión incorpora pasivamente en toda su superficie la proteína OVA.
- Inserción de la secuencia de OVA con las secuencias que rodean inicio de la traducción optimizadas, bajo el promotor CAG, para su expresión en células de mamífero (pFB-OVA_{cag}).

Los vectores de transferencia finales fueron caracterizados utilizando mapeo con enzimas de restricción. El vector que contiene OVA fusionada al extremo N terminal de una copia extra de la proteína de cápside VP39 (pFB-OVA_{cd}) y que permite la generación

de cápsides quiméricas en el BV recombinante había sido construido y caracterizado previamente en el laboratorio [104].

La figura a continuación muestra los patrones esperados y obtenidos para cada construcción.





Los patrones de restricción obtenidos para los clones pFB-OVAsd #1y pFB-OVAcag #2 se correspondieron con los esperados y por ello fueron seleccionados como vectores de transferencia.

Generación de los bácmidos recombinantes

Para obtener los bácmidos recombinantes, se transformaron bacterias *E. coli* DH10Bac con aproximadamente 100 ng de preparaciones de alta calidad de cada clon seleccionado. La selección se realizó en placas LB-kanamicina-tetraciclina-gentamicina. La presencia de IPTG y Bluo-gal permitió diferenciar colonias en las que había ocurrido el evento de transposición (fenotipo blanco) por recombinación sitio específica mediante las secuencias Tn7 presentes en el vector de transferencia y en el bácmido bMON14272. Se reestriaron varias colonias de cada construcción y se inocularon cultivos líquidos a partir de colonias de estrías que resultaron completamente blancas. Los bácmidos se extrajeron empleando el protocolo de minipreparaciones de DNA ligeramente modificado. Se confirmó la presencia del *cassette* transpuesto en el bácmido recombinante mediante PCR con los oligonucleótidos específicos universales M13 *for* y *rev* que hibridan en el bácmido por fuera de los sitios de transposición, y oligonucleótidos internos que hibridan en secuencias específicas del *cassette*. La figura R3 representa el evento de transposición y los *primers* utilizados para la caracterización por PCR. Las figuras R4 y R5 muestran los resultados obtenidos para clones de Bácmidos OVA_{sd}, OVA_{cd} y OVA_{cag}.

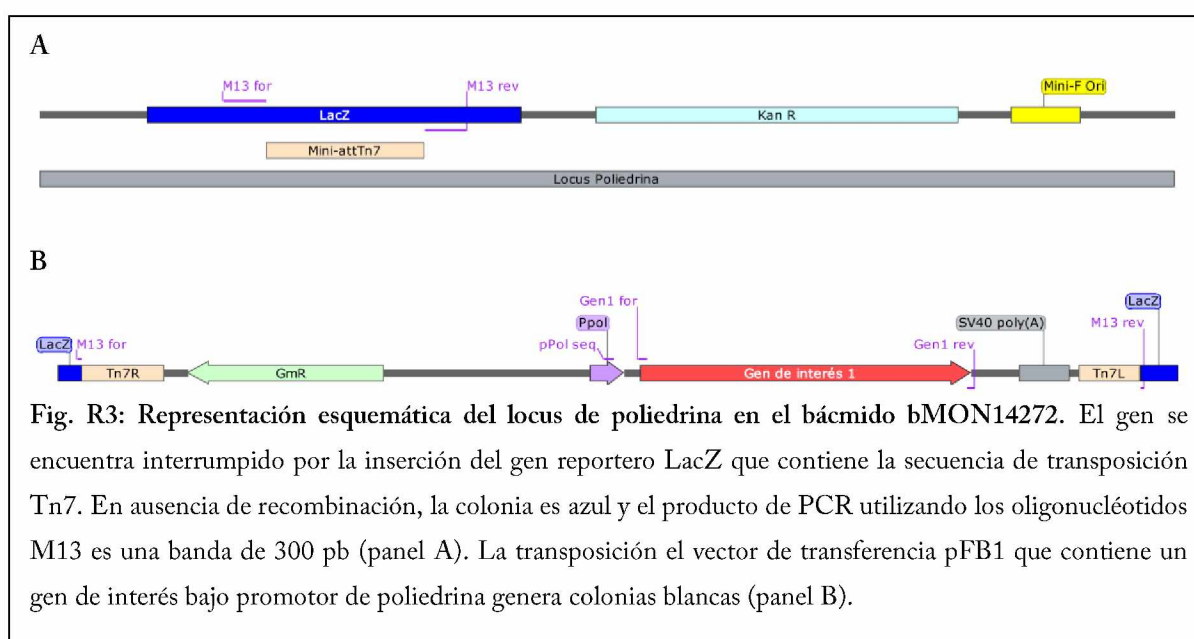
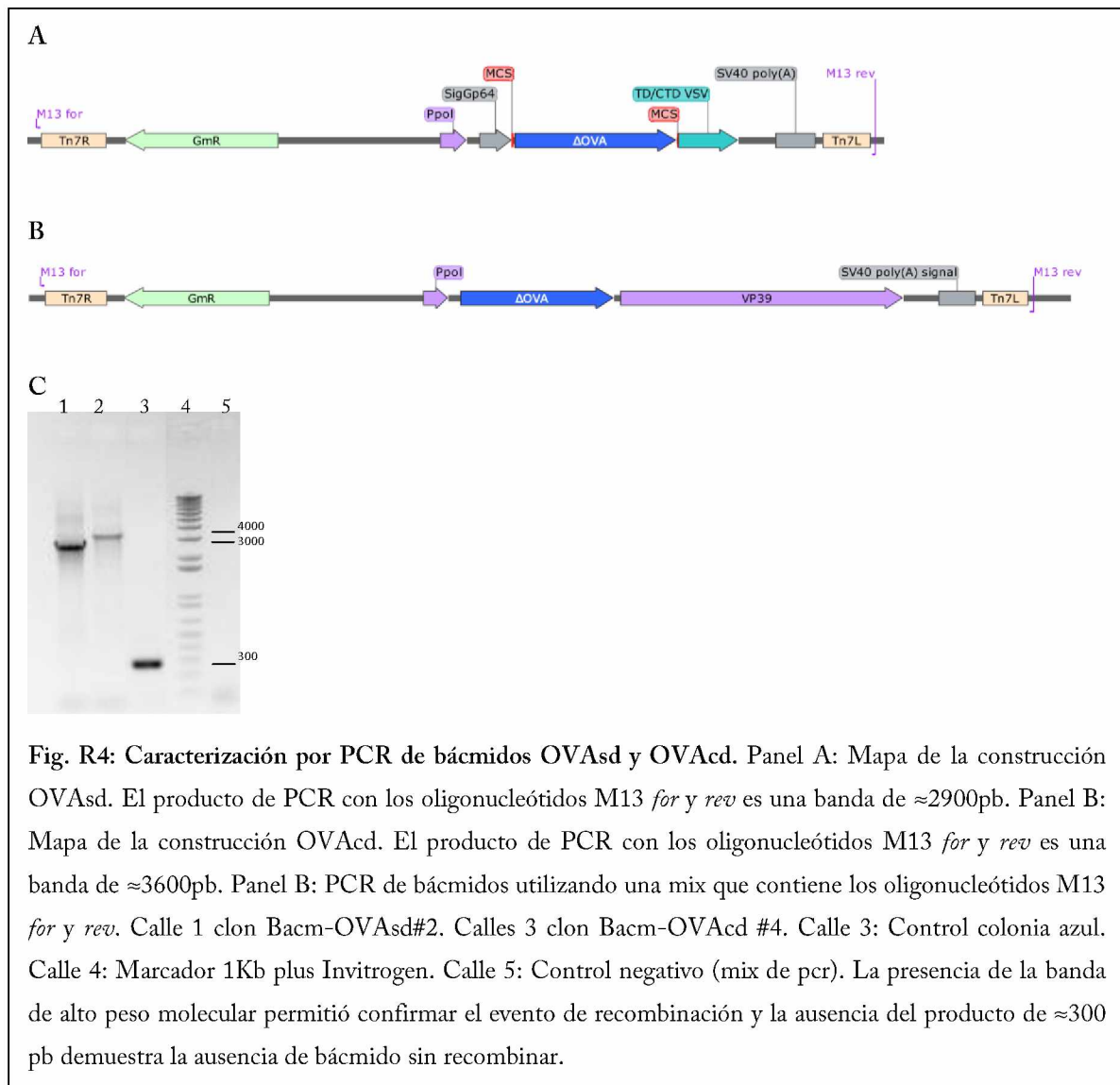


Fig. R3: Representación esquemática del locus de poliedrina en el bácmido bMON14272. El gen se encuentra interrumpido por la inserción del gen reportero LacZ que contiene la secuencia de transposición Tn7. En ausencia de recombinación, la colonia es azul y el producto de PCR utilizando los oligonucleótidos M13 es una banda de 300 pb (panel A). La transposición el vector de transferencia pFB1 que contiene un gen de interés bajo promotor de poliedrina genera colonias blancas (panel B).



pasajes a baja moi en células Sf9 crecidas en monocapa. La caracterización de los BV-OVA recombinantes se realizó por inmunomicroscopía y por *western blot* utilizando pasajes virales con títulos iguales o superiores a 1×10^8 ufp/ml.

Caracterización por inmunomicroscopía de fluorescencia

Para evaluar la expresión y localización celular del antígeno modelo en las diferentes construcciones, se realizaron ensayos de inmunomicroscopía de fluorescencia de células Sf9 infectadas con BV-OVAsd o BV-OVAcd, y de células BHK-21 transducidas con el BV-OVAcag. En todos los casos, las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos. Se utilizaron 3×10^5 células por pocillo y una moi aproximada de 10 en las infecciones de células Sf9 y 100 en las transducciones de BHK-21. En todos los casos, 48 hs pos tratamiento con virus, las células fueron lavadas, fijadas y marcadas.

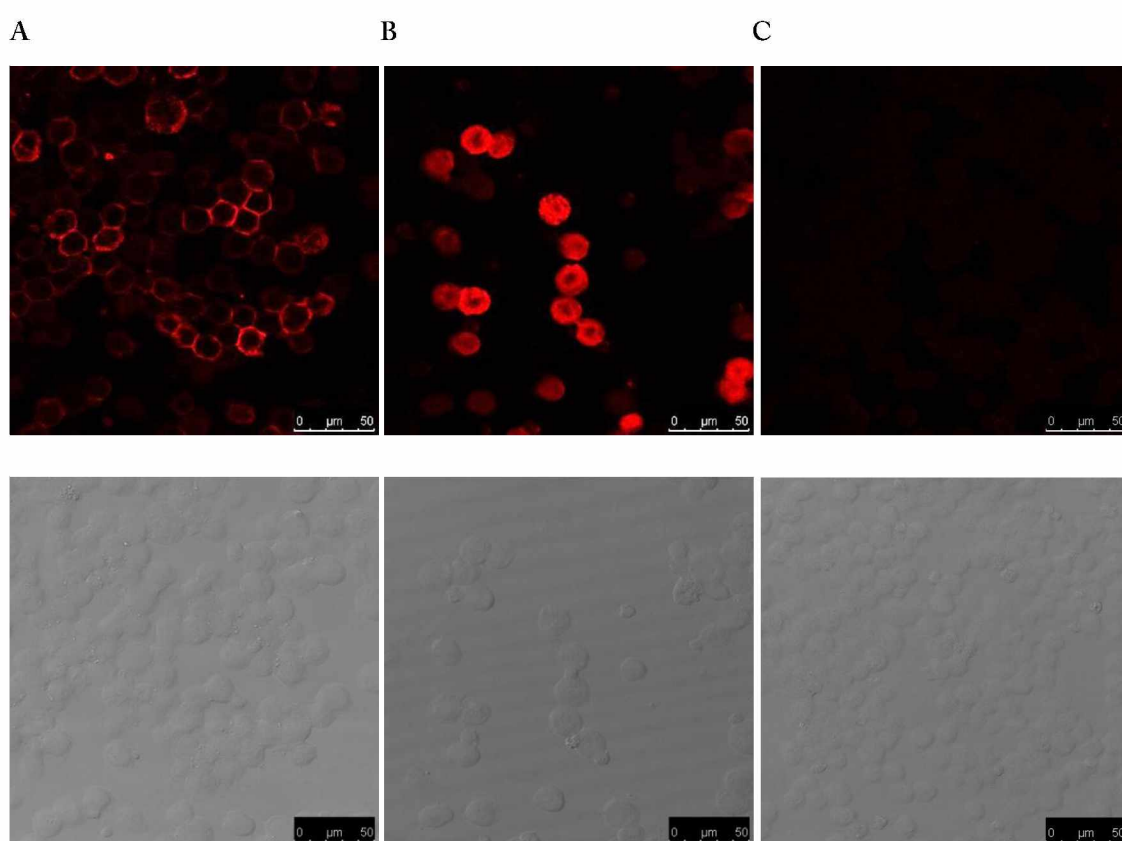


Fig. R6: Caracterización microscopía de fluorescencia de células Sf9 infectadas con los BV recombinantes. Panel A: BV-OVAsd. Panel B: BV-OVAcd. Panel C: BV-Wt. Se utilizó como anticuerpo primario un suero policlonal anti-OVA y el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado al fluoróforo Alexa 546. La escala representa 50 μm .

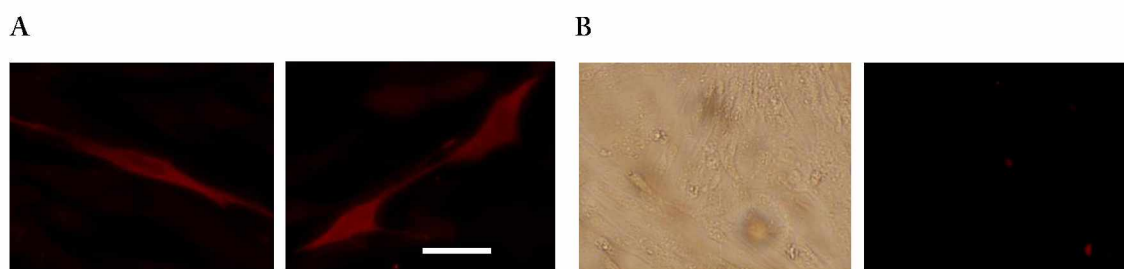


Fig. R7: Caracterización microscopía de fluorescencia de células BHK transducidas con BV-OVAcag. Se utilizó como anticuerpo primario un suero policlonal anti-OVA y el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado al fluoróforo Alexa 546. A: Transducción con BV-OVAcag. La barra representa 100 μm . B: Control, transducción realizada con BV-Wt.

Las micrografías obtenidas permitieron confirmar la correcta expresión y localización celular de OVA. La expresión dentro del *cassette* SD dirige la proteína OVA hacia la membrana plasmática de células Sf9 infectadas (Fig. R6 Panel A). Por otro lado, se observa una clara señal en el citoplasma luego de la infección con la construcción que permite la expresión de dicha proteína como fusión a VP39 (Fig. R6 Panel B). Finalmente, el citoplasma de células BHK-21 transducidas con el baculovirus que dirige la expresión de OVA bajo el promotor CAG presentaron fluorescencia (Fig. R7 Panel A), evidenciando la adecuada transducción de estas células por vectores baculovirales.

Caracterización por *Western blot*

Para confirmar la presencia del antígeno heterólogo en los viriones brotados, se concentraron por centrifugación muestras de 2 ml de los diferentes baculovirus recombinantes. Los *pellets* se resuspendieron en *cracking buffer* 1X, se resolvieron por SDS-PAGE y finalmente se caracterizaron mediante *Western blot*.

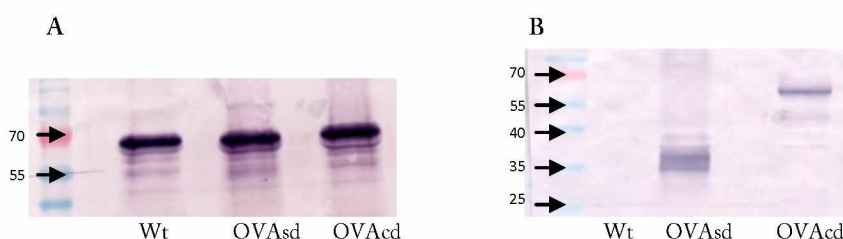


Fig. R8: Caracterización por *Western blot* de los BV-OVAsd ($\approx 33\text{KDa}$) y OVAcD ($\approx 60\text{KDa}$). Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados a la enzima fosfatasa alcalina y el revelador comercial NBT-BCIP. A: Anticuerpo primario: monoclonal anti-Gp64. B: Anticuerpo primario: suero policlonal anti-OVA.

La presencia de bandas específicas en las muestras de virus de las diferentes construcciones confirmó la presencia de OVA en la partícula viral. Asimismo, se puede observar que, a cantidades semejantes de virus, la construcción SD incorpora mayor cantidad de OVA respecto a la construcción CD. Por otro lado, la movilidad electroforética observada para OVA_{sd} es superior a la deducida de su secuencia aminoacídica. En la Fig. R9 calle 1 se muestra que el tratamiento de una muestra de este virus con la enzima PNGaseF (NEB) reduce el peso molecular de la proteína al del tamaño esperado. Dicha enzima es una amidasa que permite el clivaje entre residuos N-acetilglucosamina y Asparagina de proteínas N-glicosiladas. La glicosilación de esta proteína es consistente con el tránsito a través de la vía secretoria.

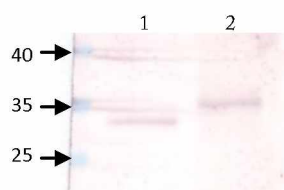


Fig. R9: Caracterización por *western blot* de la glicosilación de BV-OVA_{sd}. Calle 1, BV-OVA_{sd} digerido con la enzima Pengasa. Se observa una banda de tamaño menor a 35KDa, lo que correspondería al peso molecular esperado (33KDa). Calle 2, BV-OVA_{sd} tratado de forma semejante pero en ausencia de enzima. Se observa una banda de tamaño apenas superior a los 35KDa.

Por otro lado, para confirmar la localización de OVA en los diferentes baculovirus, se realizaron ensayos de *Western blot* de muestras tratadas previamente con un *buffer* conteniendo el detergente no iónico Tritón X-100, que permite la remoción de la envoltura y la liberación de las nucleocápsides. En la fig. R10 puede observarse la presencia de OVA en la fracción correspondiente a BV-OVA_{sd} sin tratamiento con detergente (calle 1), mientras que el tratamiento con dicho detergente remueve el antígeno de la partícula viral (calle 2). Por otro lado, la fusión OVA_{cd} se detecta en las muestras de ambos tratamientos (calles 3 y 4), confirmando que se localiza en la cápside viral.

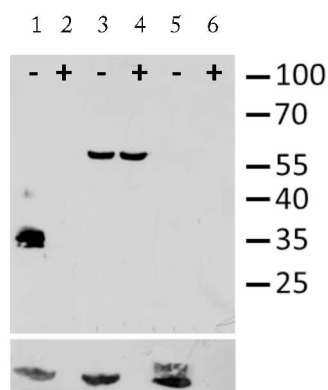


Fig. R10: Caracterización de la localización de OVA en los viriones por *Western blot*. Calle 1 y 2: BV-OVAsd. Calle 3 y 4: BV-OVAcD. Calle 5 y 6: BV-Wt. El signo (+) indica tratamiento con Tritón, mientras que el signo (-) indica tratamiento con el mismo *buffer* pero en ausencia del detergente. Panel superior: Anticuerpo primario: suero policlonal anti-OVA. Panel inferior: Anticuerpo primario: monoclonal anti-Gp64. Se emplearon anticuerpos secundarios conjugados a la enzima peroxidasa y el revelador comercial *West Pico*.

Evaluación de la respuesta citotóxica específica para OVA

Con el objetivo de evaluar la capacidad de las diferentes estrategias de presentación (cápside, superficie, transducción) de despertar una respuesta inmune de tipo celular mediada por linfocitos T citotóxicos, se realizaron ensayos de citotoxicidad *in vivo* y de medición de producción de INF- γ por ELISA.

Citotoxicidad *in vivo*

Se inmunizaron grupos de 4 ratones hembras C57BL/6J de 6 a 8 semanas de edad al inicio del experimento vía i.v. en el seno retro-orbital con 5×10^7 ufp/ratón utilizando como inmunógenos *stocks* virales titulados y caracterizados de las diferentes construcciones generadas. 7 días post inmunización se sacrificaron ratones *naïve*. Los esplenocitos fueron divididos en partes iguales, una de las cuales fue cargada con el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ clase I y una concentración alta de CFSE. El resto de las células fueron marcadas sólo con CFSE en baja concentración. La mezcla de ambas suspensiones celulares fue inyectada por vía intravenosa (seno retroorbital) a cada uno de los ratones que había sido inmunizado al día 1 (2×10^7 células/ratón). A las 20 hs se sacrificaron los animales y una muestra de los

esplenocitos aislados fue analizada por citometría de flujo. Se calculó el porcentaje de lisis específica como $[1 - (R_{\text{animal control}} / R_{\text{animal experimental}})] \times 100$, donde R = % de células CFSE bajo / % de células CFSE alto. Para realizar el análisis estadístico se empleó el programa GraphPad® versión 6.0 para Windows (La Jolla, CA). La figura R12 (panel A) muestra los resultados del test estadístico de ANOVA (Análisis de la Varianza). Se utilizó el post test de Bonferroni para realizar las comparaciones entre los grupos y los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Adicionalmente, una fracción de los esplenocitos fue utilizada para su reestimulación *in vitro*.

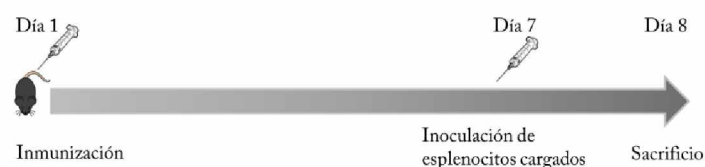


Fig. R11: Esquema de inmunización. Ratones C57BL/6J se inmunizaron con 5×10^7 ufp de BVs por vía i.v. Siete días post inmunización, los animales fueron inoculados con esplenocitos cargados con el péptido SIINFEKL (OVA₂₅₈₋₂₆₅) y marcados con CFSE.

Determinación de IFN- γ en sobrenadante de cultivo de esplenocitos

Los esplenocitos obtenidos se cultivaron en placas en presencia de péptido de clase I (OVA₂₅₇₋₂₆₄) utilizando una concentración final de $1\mu\text{g/ml}$ en medio de cultivo completo. Asimismo, fueron cultivadas muestras de cada uno de los ratones sin reestímulo específico (*mock*). A las 72 hs se colectaron los sobrenadantes y se determinó la concentración de IFN- γ por ELISA utilizando el kit comercial *Mouse IFN- γ ELISA Set* (BD OptEIA). La figura R12 (panel B) muestra los resultados obtenidos del test estadístico de ANOVA y el post test de Bonferroni para realizar las comparaciones entre los grupos. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

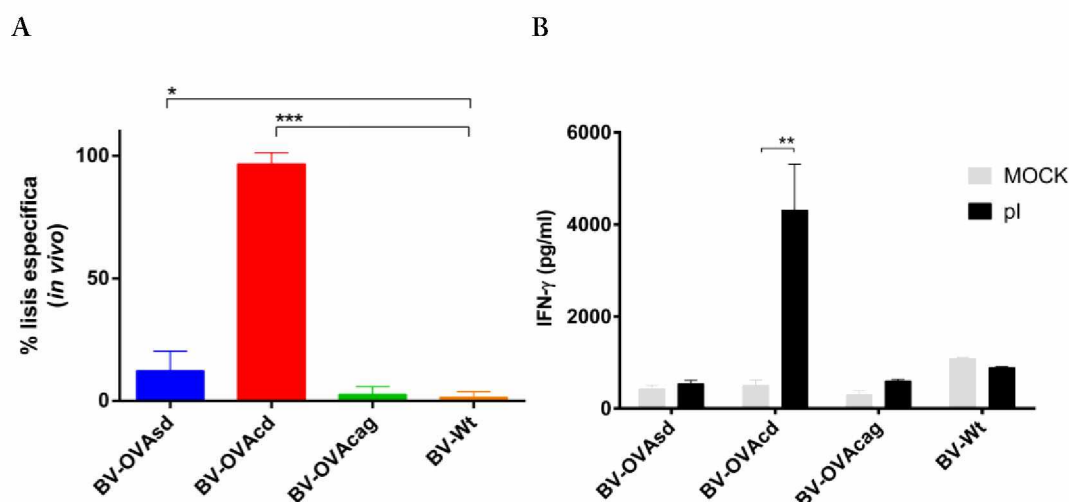


Fig. R12: Respuesta citotóxica específica. A: El porcentaje de lisis específica se calcula como $[1 - (R \text{ animal control} / R \text{ animal experimental})] \times 100$, donde $R = \% \text{ de células CFSE bajo} / \% \text{ de células CFSE alto}$. B: Cuantificación de IFN- γ en el sobrenadante de cultivo de esplenocitos reestimulados in vitro con medio de cultivo (mock) o el péptido OVA clase I (OVA₂₅₇₋₂₆₄). Se realizó un ANOVA con posterior aplicación del test de múltiples comparaciones Bonferroni. (*, $p < 0,05$. **, $p < 0,01$. ***, $p < 0,001$)

Los resultados mostraron que, a las dosis ensayadas, la presentación en cápside permitió alcanzar el 100% de lisis específica. Esta fuerte respuesta citotóxica fue acompañada de una producción significativa de IFN- γ por los esplenocitos reestimulados con el péptido SIINFELK. Dado que se sabe que este péptido se une con alta afinidad a las moléculas del CMH de clase I de los ratones C57BL/6, los resultados indican que los linfocitos T CD8+ son los responsables de la producción de IFN- γ .

Por otro lado, la construcción OVAsd también fue capaz de generar respuesta citotóxica, aunque el valor alcanzado fue solo del 12 % y no se observó una producción estadísticamente significativa de IFN- γ en los esplenocitos frente al reestímulo específico de antígeno. A las dosis y condiciones ensayadas, la estrategia de transducción no generó una respuesta CTL detectable al inmunizar por vía i.v. Cuando este ensayo fue repetido en iguales condiciones pero inmunizando a los animales por vía i.m., los resultados mostraron un mayor porcentaje de citotoxicidad (media de 5,6 % versus 2,6 % alcanzado por vía i.v.), aunque el valor alcanzado no fue estadísticamente significativo respecto al control. Debido al menor volumen máximo permitido en esta vía, la dosis utilizada para este experimento corresponde a la mitad de la dosis utilizada en el experimento anterior.

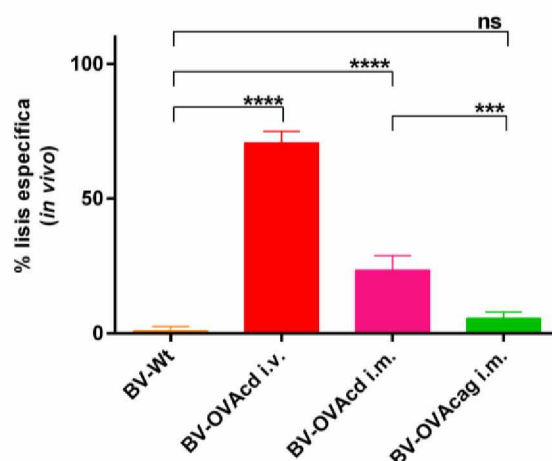


Fig. R13: Respuesta citotóxica específica. Ratones C57BL/6J se inmunizaron con $2,5 \times 10^7$ ufp de BVs por vía i.m. (volumen máximo de inoculación: 100 μ l). Siete días post inmunización, los animales fueron inoculados con esplenocitos cargados con el péptido SIINFEKL (OVA₂₅₈₋₂₆₅) y marcados con CFSE. El porcentaje de lisis específica se calcula como $[1 - (R \text{ animal control} / R \text{ animal experimental})] \times 100$, donde R = % de células CFSE bajo / % de células CFSE alto.

En conjunto, los resultados obtenidos demostraron que la presentación en cápside constituye la mejor estrategia para montar una respuesta celular citotóxica específica y son consistentes con la generación de dicha respuesta por el mecanismo de presentación cruzada de antígenos exógenos en células dendríticas.

Evaluación de la respuesta humoral

Con el objetivo de evaluar, caracterizar y comparar la respuesta humoral generada por las diferentes estrategias de presentación, se inmunizaron animales utilizando *stocks* virales titulados y caracterizados de las diferentes construcciones generadas. Se inmunizaron grupos de 4 ratones hembras Balb/c de 6 semanas de edad vía i.p. con 1×10^8 ufp/ratón. Se realizaron 3 inmunizaciones sucesivas espaciadas por 15 a 21 días. Las muestras de suero fueron colectadas antes de cada inmunización y hasta 40 días después de la última dosis. La figura R14 muestra el esquema de inmunización y toma de muestras. Se tomaron muestras de suero pre-inmune antes del inicio del experimento.

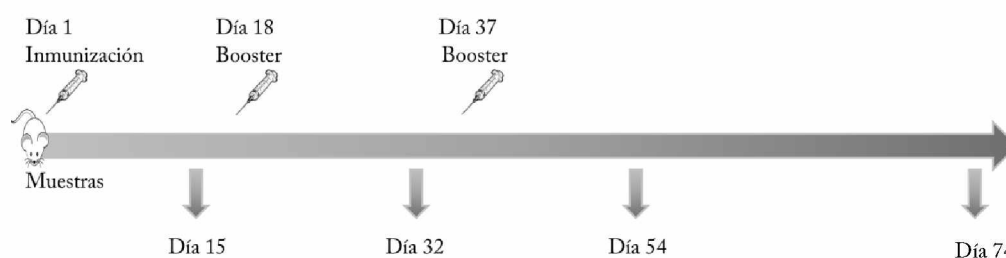


Fig. R14: Esquema de inmunización y toma de muestras de suero. Se inmunizaron ratones Balb/c con 3 dosis de 1×10^8 ufp/ratón por la vía i.p. Se tomaron 5 muestras de suero a diferentes tiempos post-inmunización.

Determinación de anticuerpos totales contra OVA y contra BV

Para determinar la presencia y el título de anticuerpos totales específicos contra el antígeno y contra el vector, se analizaron por ELISA indirecto diluciones seriadas al medio de *pools* de los sueros provenientes de las diferentes inmunizaciones. Se determinó el título de anticuerpos totales específicos contra OVA (Fig. R15, panel A) o contra el vector (panel B), considerando como punto de corte el promedio de los sueros pre inmunes más dos desvíos estándar ($X_{neg} + 2\sigma$).

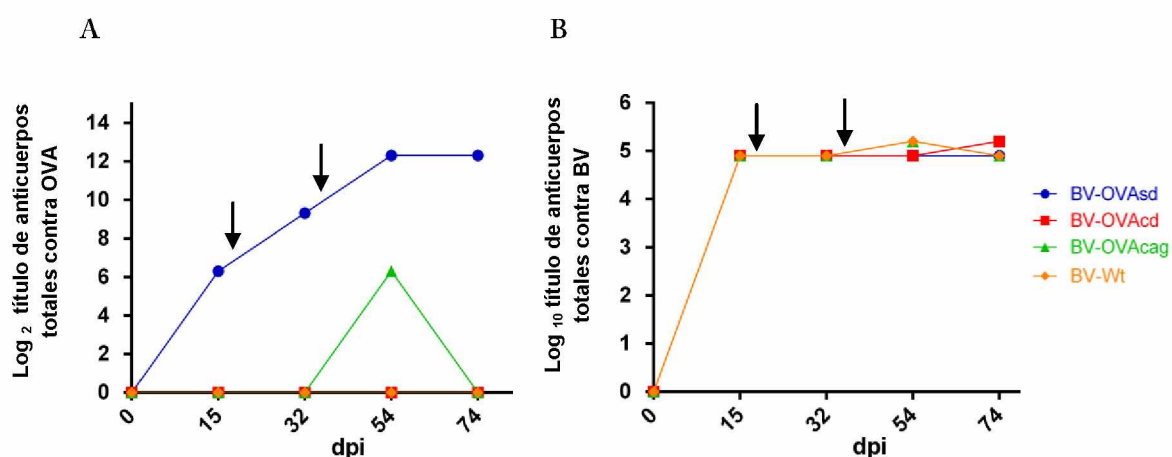


Fig. R15: ELISA de anticuerpos totales contra OVA y contra BV. Se inmunizaron ratones Balb/c con 3 dosis de 1×10^8 ufp/ratón vía i.p. Se tomaron 5 muestras de suero a diferentes días post primer inmunización (dpi). Las flechas indican los *boosters*. Panel A: Título de anticuerpos totales contra OVA. Panel B: Título de anticuerpos totales contra BV.

Los sueros de los ratones inmunizados con la construcción que presenta OVA en la superficie del virión mostraron niveles detectables de anticuerpos específicos para OVA tras la primera inmunización. Además, el título se incrementó luego de la segunda y tercera

inmunización y se mantuvo hasta el final del experimento. Por otro lado, la estrategia de transducción generó anticuerpos específicos sólo después de tres inmunizaciones y dichos anticuerpos no se mantuvieron en el tiempo. Finalmente, los animales inmunizados con baculovirus salvajes o con la construcción que transporta el antígeno en la cápside no generaron anticuerpos específicos a lo largo de todo el experimento. Estos resultados concuerdan con el mecanismo de activación de los linfocitos B, en el cual la célula debe interactuar directamente con el antígeno a través de su receptor de inmunoglobulina de membrana.

Para todas las construcciones se obtuvieron niveles similares de anticuerpos contra el vector, indicando que las cantidades de los diferentes inmunógenos utilizados fueron semejantes. Como se esperaba, debido a la mayor masa de antígenos propios del sistema respecto de la fusión a OVA en la superficie de los baculovirus, los niveles de anticuerpos contra el vector fueron superiores a los obtenidos contra el antígeno heterólogo.

Determinación del perfil de isotipos de los anticuerpos despertados

A fin de caracterizar el perfil de respuesta humoral contra OVA y contra BV, se analizó el perfil de isotipos en el grupo inmunizado con BV-OVAsd y BV-Wt. Se utilizaron los *pools* de sueros correspondientes al tercer sangrado (máximo título de anticuerpos totales específicos). Para la determinación de isotipos anti OVA se utilizó una dilución 1:20 (se analizó sólo el *pool* de sueros del grupo BV-OVAsd) y para la determinación de isotipos anti BV, 1:1.000 (en este caso se analizaron ambas muestras de suero). Se consideró como punto de corte el promedio de los sueros pre inmunes más dos desvíos estándar ($\bar{X}_{neg} + 2\sigma$). Los resultados se expresan como porcentaje de cada isotipo, considerando el 100 % como la suma de todos los isotipos analizados. La figura R16 muestra los resultados obtenidos.

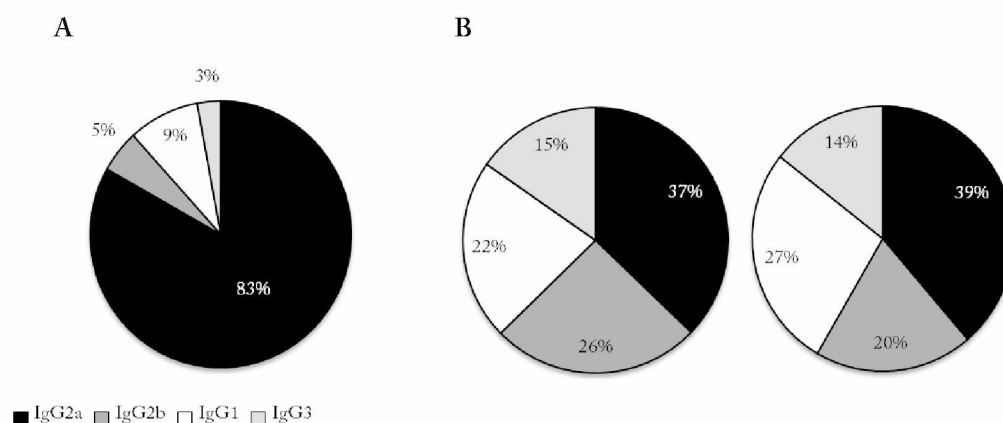


Fig. R16: ELISA de isotipos contra OVA y contra BV. Se analizaron diluciones fijas de los *pools* del tercer sangrado de los grupos BV-OVAsd y BV-Wt. Panel A: Perfil de isotipos específicos para OVA para el grupo BV-OVAsd. Panel B: Perfil de isotipos contra el vector para el grupo BV-OVAsd (izquierda) y para el grupos BV-Wt (derecha).

La generación de respuesta humoral requiere no sólo que el LB reconozca al antígeno a través de su receptor, sino también la interacción con un linfocito Th previamente activado por una célula presentadora profesional, lo que constituye la segunda señal. Sólo las células dendríticas son capaces de activar y promover la diferenciación de LTh vírgenes. Para esto es necesario entonces que una célula dendrítica capture el antígeno, se active, lo procese y presente péptidos derivados del mismo en moléculas del CMH-II. Además, la célula dendrítica producirá y liberará al medio citoquinas en respuesta a la activación de sus PRR por acción de los PAMPs que acompañan al antígeno. Esto condicionará el perfil de diferenciación del LTh. A su vez, los diferentes subtipos de LTh producen y liberan citoquinas que influirán en el perfil de respuesta humoral. La caracterización de los sueros mostró que los anticuerpos específicos para el antígeno son en su mayoría del tipo IgG2a, lo que corresponde a un perfil de activación y diferenciación linfocitaria inclinado hacia Th1. Estos resultados reflejan lo ya descrito por nuestro laboratorio y por otros grupos, que los vectores baculovirales son capaces de generar la producción de altos niveles de IFN- γ , sesgando el perfil de diferenciación linfocitaria hacia un perfil Th1.

Sin embargo, al analizar los anticuerpos contra el vector, encontramos un perfil más balanceado de los isotipos en ambas muestras, indicando también la participación de LTh2.

Esto podría deberse a la mayor proporción y densidad de antígeno en masa de vector, lo que resulta en una dosis muy superior de "antígeno-vector" respecto al antígeno específico OVA. Como se mencionó, en la caracterización de los BV por *Western blot* es posible observar una cantidad muy superior de la proteína mayoritaria de superficie, Gp64. Esta proteína aparece concentrada en uno de los extremos del virión, dando lugar a una estructura en forma de espiga, a la cual se denomina "peplómero". Estas diferencias en cantidad, densidad y distribución de ambos antígenos podría tener influencia en las diferencias en el perfil de isotipos observados.

CAPÍTULO II

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA FORMULACIÓN DE LOS BV-OVA CON ADYUVANTES CLÁSICOS

Introducción

Los adyuvantes son compuestos incorporados a las vacunas para aumentar la inmunogenicidad de los antígenos contenidos en las mismas, es decir, aumentar su capacidad para producir una respuesta inmunitaria en el individuo vacunado.

Las primeras vacunas contenían bacterias enteras muertas, virus atenuados o inactivados, o toxoides bacterianos. Eran menos purificadas que las producidas con los métodos modernos y contenían "adyuvantes intrínsecos", que incluían concentraciones mínimas de exotoxinas o endotoxinas activas. La propiedad adyuvante intrínseca de estas vacunas aumentaba las respuestas inmunitarias y podía ser utilizada para aumentar la inmunogenicidad de otros antígenos administrados con ellas. En la actualidad, muchas vacunas recombinantes están compuestas por antígenos altamente purificados que pueden producir una respuesta inmunitaria insuficiente. Los procesos de inactivación y purificación eliminan parcial o totalmente las señales de peligro naturales (PAMPs) y los adyuvantes actúan como sustitutos de las mismas, estimulando y dirigiendo la respuesta inmune.

Los adyuvantes tienen objetivos diferentes ante determinadas situaciones. La administración de vacunas en poblaciones especiales debido al estado particular de su sistema inmunitario, como pueden ser la población anciana o la de individuos inmunodeficientes, requiere un aumento adicional del sistema inmune. En ocasiones hay patógenos que requieren una compleja y amplia respuesta inmunitaria, y necesitan una respuesta potente y extensa, como es el caso de la malaria, VIH o las tuberculosis bovina y humana. Por último, la necesidad de grandes cantidades de antígeno en determinadas situaciones, como en el caso de pandemias, requiere necesariamente del empleo de adyuvantes a fin de reducir la cantidad de antígeno necesaria en las vacunas, permitiendo aumentar la producción.

Mecanismos de acción de los adyuvantes

Las células dendríticas son las células presentadoras profesionales más importantes del sistema inmune, dado su rol como principal vínculo de unión entre la inmunidad innata y la adquirida. El desarrollo de una potente respuesta adaptativa depende principalmente de su correcta activación e interacción con los linfocitos T colaboradores. Resulta lógico entonces estudiar los efectos de los adyuvantes sobre estas células.

Los adyuvantes actúan a través de los siguientes mecanismos:

- Efectos en la regulación de la liberación antigénica
- Acción sobre la inmunidad innata y adquirida: Inducción de citoquinas inmunorreguladoras.
- Efectos sobre la vía de entrada a las células presentadoras de antígenos (CPA).

Efectos adyuvantes en la liberación antigénica

El mecanismo que originariamente se atribuyó a los adyuvantes fue el llamado efecto de liberación lenta, o *depot*, por el cual las sales minerales (como el hidróxido de aluminio) o emulsiones adyuvantes (como el adyuvante de Freund) se asocian con el antígeno y aumentan su "semivida" biológica e inmunológica en el lugar de la inyección. En el momento de la administración, las partículas de los adyuvantes causan inflamación en el lugar de la inyección y las CPA son atraídas. Así, los macrófagos y las células dendríticas pueden incorporar el antígeno que se libera lentamente, o puede captarlo asociado al adyuvante. Retomaremos la importancia de esta diferencia más adelante.

Si bien es cierto que este mecanismo interviene, se demostró que esta explicación de la acción de los adyuvantes es por sí sola demasiado simplificada, y se ha redefinido para explicar la mayor liberación de antígenos a las CPA y a los órganos linfoides secundarios. La inmunogenicidad de péptidos sintéticos y otros antígenos solubles, que de otro modo serían rápidamente eliminados del lugar de la inyección, sin liberación adecuada hacia el ganglio linfático eferente, se puede mejorar usando sales o emulsiones como adyuvantes.

Acción sobre la inmunidad innata y adquirida: Inducción de citoquinas inmunorreguladoras.

Hasta no hace mucho tiempo se pensaba que el sistema inmune innato tenía una función no específica e independiente del sistema inmunitario adquirido. Hoy se sabe que la respuesta inmune innata reconoce y responde específicamente a los distintos tipos y clases de patógenos. Esta capacidad que presenta el sistema inmune innato de reconocer PAMPs se debe al repertorio PRR que poseen. Esto lleva al aumento de la expresión de proteínas requeridas para la presentación antigénica y de las moléculas coestimuladoras. La maduración de la CD conduce a la producción de mediadores inflamatorios que tienen un importante accionar en el control del agente infeccioso, previa puesta en marcha de la inmunidad adaptativa y en la calidad de la respuesta primaria de los LT efectores. Así, el éxito en la generación de una adecuada respuesta adaptativa depende justamente de la presencia de estos patrones de peligro acompañando al antígeno.

El resultado del reconocimiento y unión al receptor PRR es la inducción de la producción y liberación de citoquinas proinflamatorias y quimiocinas, las cuáles son parte del mecanismo efector de la respuesta inmune innata. Las quimiocinas atraen fagocitos y células inmunes al sitio de la infección, o en el caso de la vacuna, al sitio de la inyección. Los adyuvantes pueden estimular la producción de diferentes citoquinas y quimiocinas, que tienden a actuar directamente o indirectamente sobre el subgrupo de los linfocitos T colaboradores para regular las respuestas inmunes.

Se han identificado hasta la fecha 3 familias de PRR: los TLR (receptores *Toll-like*), localizados en la membrana plasmática y en los endosomas, reconocen patrones moleculares de bacterias, virus, hongos, y protozoos; los receptores *RIG-like*, localizados en el citoplasma, que reconocen virus, y los receptores intracelulares *Nod-like* (NLR). La activación de los diferentes receptores culmina en la producción de citoquinas específicas, que son liberadas, no sólo por las CD sino también por macrófagos y otras células del sistema inmune innato que poseen estos receptores y que son reclutados al sitio de inmunización. El resultado es un entorno de citoquinas producidas por varios tipos

celulares, que tienen efecto sobre las CD y su interacción con células T colaboradoras, condicionando así el perfil T obtenido. Por ejemplo, recientemente han sido publicados trabajos que demuestran que las sales de aluminio tienen también actividad inmunoestimuladora directa. Se ha demostrado *in vitro* que el aluminio activa monocitos y macrófagos. Las sales de aluminio estimulan el sistema inmune innato, favoreciendo la maduración de las células dendríticas mediante la activación de receptores citoplásmicos NLRs, concretamente los Nlrp3 (conocido también por Nalp3) [107]. Este proceso depende de la fagocitosis del aluminio por las células presentadoras de antígeno. La activación de Nalp3 produce caspasa-1 activada. Esta molécula es conocida como enzima convertidora de IL-1 porque transforma la prointerleuquina en IL-1 activada, desencadenando la secreción de citoquinas inflamatorias y la expresión moléculas coestimuladoras como CD86, que finalmente acaban induciendo la diferenciación Th2.

Efectos sobre la vía de entrada a las células presentadoras de antígenos (CPA).

Como mencionamos anteriormente, los adyuvantes pueden actuar estimulando la maduración de las células dendríticas, aumentando la captación, procesamiento y presentación de antígenos y también a través de su capacidad de interactuar con LT, mediante la activación de PRR. Por otro lado, una formulación vacunal podría modificar la entrada del antígeno a la CPA, lo que influye no sólo en la posibilidad del adyuvante de interactuar con uno u otro tipo de PRR sino también en la vía de procesamiento y presentación en CMH del antígeno específico. Los antígenos que siguen la vía exógena son procesados en fagosomas y los péptidos correspondientes son cargados y presentados en la superficie celular en el contexto del CMH-II, lo que permite su interacción con LT CD4. Los antígenos sintetizados *de novo* dentro de la célula son procesados por el proteasoma y los péptidos son cargados en el CMH-I, lo que permite su presentación a LT CD8. Asimismo, las CD derivadas de la médula ósea tienen la capacidad de presentar antígenos proteicos internalizados del ambiente extracelular en moléculas del CMH-I, mecanismo conocido como presentación cruzada o *cross-presentation*. También ha sido reportada la existencia de una segunda vía cruzada a través de la cual antígenos que debieran ser

procesados por vía endógena y sus péptidos clase I cargados en el CMHI, son redirigidos a la ruta exógena y sus péptidos presentados en CMH-II [108]

Lo mencionado anteriormente revela la importancia de la vía a través de la cual el antígeno entra en la célula presentadora y previamente mencionamos el caso de los péptidos formulados con hidróxido de aluminio para ejemplificar que los antígenos atrapados en las partículas de los adyuvantes pueden ser incorporados mediante fagocitosis o pueden ingresar por pinocitosis a medida que van siendo liberados del seno del adyuvante. Entonces, en este punto es importante entender la asociación física y/o química que establece el antígeno de interés con el adyuvante que se está utilizando, y cómo esa asociación puede influir en la estructura y funcionalidad del antígeno. Para péptidos solubles o ácidos nucleicos, es probable que no exista interferencia negativa. Sin embargo, cuando se trata de antígenos particulados, que poseen por sí mismos una estructura física con influencia en el tipo de respuesta, no es menor evaluar si la formulación resulta en un efecto sinérgico del aporte a la respuesta por ambas partes, o si la combinación resulta en detrimento de alguna de ellas.

En este trabajo de tesis se seleccionaron dos adyuvantes aprobados para su uso veterinario y ampliamente utilizados: el hidróxido de aluminio y un adyuvante oleoso como el adyuvante incompleto de Freund (AIF), similar al utilizado en las formulaciones vacunales para FMDV. Asimismo, se incluyó un adyuvante acuoso del grupo de los Montanide IMS, que son inmunoestimulantes altamente refinados y potentes. Están constituidos por dispersiones de partículas cuyo tamaño varía entre 50 y 500 nm, inmersos en una fase acuosa que contiene compuestos inmunoestimulantes conocidos genéricamente como sustancias GRAS (*Generally Recognized As Safe*). Su utilización se recomienda especialmente cuando la seguridad es la principal preocupación, y son capaces de inducir una respuesta inmune rápida y sostenida, especialmente en el caso de los protocolos de inmunizaciones múltiples por ejemplo los esquemas de vacunación para FMDV. Esta gama de adyuvantes es adecuada para una amplia variedad de antígenos (bacterianos, virales o

subunidades) y para administración parenteral o mucosal. Su eficacia como adyuvante en formulaciones con virus de la fiebre aftosa inactivado ha sido previamente estudiada [109].

Objetivos específicos

Evaluar el efecto de la formulación de los baculovirus recombinantes utilizando diferentes adyuvantes aprobados y/o de eficacia comprobada, seleccionar un esquema de vacunación y el/los sistemas de presentación y formulación adecuados para generar tanto respuestas de tipo celular como humoral.

Materiales y Métodos

Formulación de los BV-OVA

Adyuvantes y preparación de las formulaciones vacunales

Considerando los BV recombinantes como potenciales principios activos de formulaciones vacunales, en este trabajo de tesis se combinaron los BV-OVA con adyuvantes ampliamente utilizados y ya aprobados para su uso en animales: adyuvante incompleto de Freund (SIGMA), Montanide ESSAI IMS D 12802 VG PR (Seppic) y $\text{Al}(\text{OH})_3$ (Rehydragel®, Chemtrade). Todas las formulaciones se realizaron utilizando volúmenes iguales de BVs y adyuvante, agregando por goteo la suspensión de BV sobre el adyuvante. Para la formulación con el adyuvante incompleto de Freund, se agregó previamente Tween 40 a una concentración de 2 % a la fase acuosa (BV), se realizó la mezcla por goteo sobre el adyuvante en agitación constante y finalmente la formulación se paso a través de una aguja de 25 G.

Determinación del efecto de la formulación sobre la respuesta humoral

Para determinar el efecto sobre el título de anticuerpos generado por la combinación con adyuvantes, se realizó nuevamente el experimento de determinación de la respuesta humoral en el modelo ratón. Se empleo el esquema de inmunización y toma de muestras ya descriptos. Los inmunógenos a ensayar fueron las diferentes formulaciones utilizando en todos los casos como principio activo un *stock* viral de BV-OVAsd titulado y caracterizado por *Western blot*. Como control de referencia se inmunizó un grupo de animales con BV-OVAsd sin formular. Se incluyó como control negativo un grupo vacunado con la misma dosis de BV-Wt sin formular.

Determinación del efecto de la formulación sobre la respuesta celular citotóxica

Para evaluar el impacto de la formulación del BV sobre la respuesta citotóxica, se realizó un nuevo experimento de CTL *in vivo* en el modelo ratón. Se utilizó el protocolo ya descrito, pero la administración de las formulaciones con adyuvantes se realizó por la vía i.p. Los inmunógenos a ensayar fueron las diferentes formulaciones, utilizando en todos los casos como principio activo un *stock* viral de BV-OVAcd titulado y caracterizado por *Western blot*. Como control de referencia se inmunizó un grupo de animales con BV-OVAcd sin formular. Se incluyó como control negativo un grupo vacunado con la misma dosis de BV-wt sin formular.

Resultados

Estudio del efecto de la formulación de los BV-OVA con adyuvantes

En el capítulo anterior comparamos *vis a vis* las diferentes estrategias de presentación en el virión brotado y pudimos comprobar que la fusión a la proteína de cápside es la estrategia que favorece la generación de una potente respuesta celular citotóxica, mientras que la presentación utilizando el *cassette* SD facilita generar anticuerpos específicos e incrementar el título de los mismos mediante dosis sucesivas.

Con el objeto de evaluar si estas respuestas pueden ser incrementadas o moduladas, se evaluó el efecto de incorporar a la formulación de los BV recombinantes adyuvantes aprobados y utilizados ampliamente en vacunas animales.

Evaluación del efecto de la formulación sobre la respuesta humoral

Históricamente, las mejores y más potentes respuestas mediadas por anticuerpos fueron generadas utilizando inmunógenos cuya potencia *per se* no necesariamente era elevada, pero su formulación con adyuvantes clásicos, como los son el adyuvante de Freund o las sales de aluminio, permitió generar protección. Por lo mencionado anteriormente, se evaluó el impacto de la coadministración de BV con adyuvantes utilizando el vector viral que permitió obtener mayores títulos de anticuerpos en el experimento de comparación de sistemas de presentación. Así, se inmunizaron grupos de 4 ratones hembras Balb/c de 6 semanas de edad vía i.p. con 5×10^7 ufp/ratón de BV-OVAsd formulado con los diferentes adyuvantes. Como control se inmunizaron ratones con BV-OVAsd sin adyuvante (grupo SA) o con BV-Wt. Se realizaron 3 inmunizaciones con intervalos de 15 a 18 días y las muestras de suero fueron colectadas 2 días antes de cada inmunización y hasta 20 días después de la última dosis. Se utilizaron los mismos protocolos de ELISA para determinar el título de anticuerpos totales contra OVA y contra el vector (figura R17, panel A y B respectivamente)

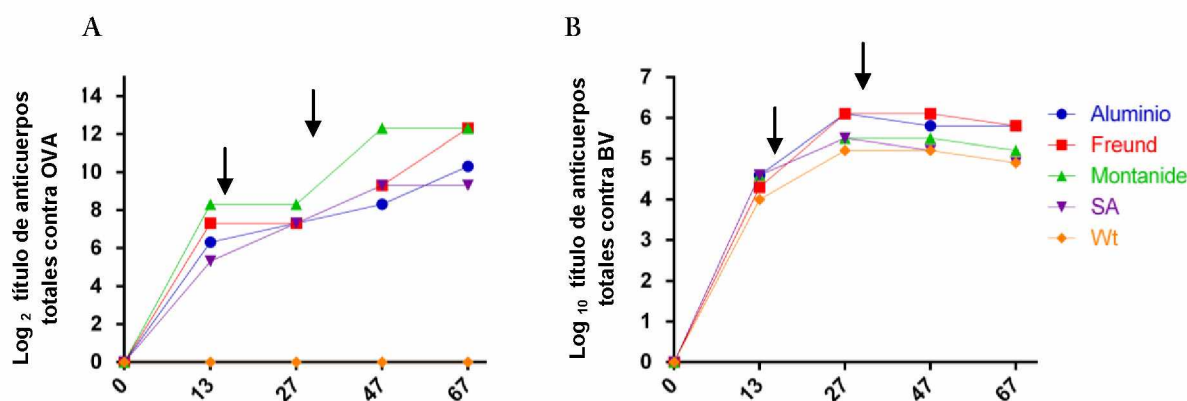
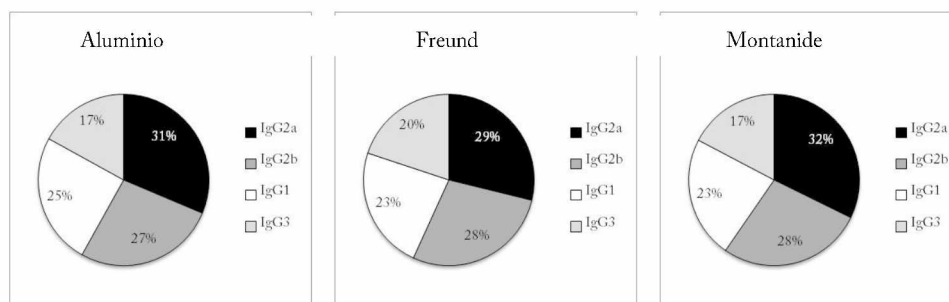


Fig. R17: Efecto de la formulación sobre el título de anticuerpos totales contra OVA y contra BV. Se inmunizaron ratones Balb/c con 3 dosis de 5×10^7 ufp/ratón por la vía i.p. de BV-OVAsd formulado con los diferentes adyuvantes o sin adyuvante (grupo SA). Como control un grupo de ratones fue inmunizado con BV-Wt sin adyuvante. Se tomaron muestras de suero a diferentes días post primer inmunización (dpi). Las flechas indican los *boosters*. Panel A: Título de anticuerpos contra OVA. Panel B: Título de anticuerpos contra BV.

La cinética de producción de anticuerpos fue similar en todas las formulaciones, tanto para los anticuerpos antígeno específicos como para los generados contra el vector. Sin embargo las formulaciones en las que se emplearon el adyuvante incompleto de Freund y el Montanide permitieron alcanzar títulos más elevados, siendo los animales vacunados con este último los que presentaron el título máximo de anticuerpos y más rápidamente. Si bien el grupo inmunizado con BV-OVAsd fue el que produjo menor título de anticuerpos (1/640), el valor alcanzado puede considerarse elevado. Asimismo, al comparar los resultados con los obtenidos en el capítulo I, donde la dosis de BV fue del doble, podemos observar que el título máximo de anticuerpos alcanzado en el experimento anterior es equivalente al alcanzado en este con las formulaciones con Freund y Montanide, evidenciando la potencia que tienen los BV como adyuvantes *per se* para generar respuesta humoral.

La determinación de isotipos mostró nuevamente un perfil balanceado para los anticuerpos contra el vector en todos los grupos. Por otro lado, la formulación con los adyuvantes modificó el perfil de isotipos de los anticuerpos contra OVA (Fig. R18, panel A y B, respectivamente)

A



B

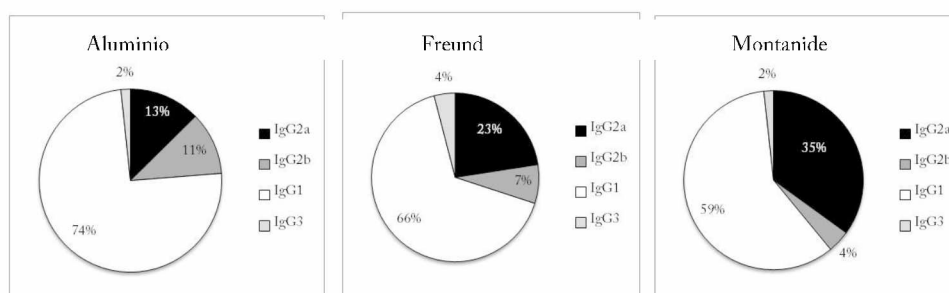


Fig. R18: ELISA de isotipos. Se analizaron diluciones fijas de los *pools* del último sangrado para todos los grupos. De izquierda a derecha, se muestran los resultados obtenidos para el grupo inmunizados con las formulaciones con hidróxido de aluminio, adyuvante incompleto de Freund y Montanide. Panel A: Perfil de isotipos contra el vector. Panel B: Perfil de isotipos contra OVA.

Evaluación del efecto de la formulación sobre la respuesta citotóxica

A fin de evaluar el impacto de la formulación sobre la potente respuesta T citotóxica generada por el BV-OVAcd, se realizó un nuevo experimento de citotoxicidad *in vivo*. Se inmunizaron grupos de 4 ratones hembras C57BL/6J de 6 a 8 semanas de edad al inicio del experimento vía i.p. con 5×10^7 ufp/ratón de BV-OVAcd formulado con los diferentes adyuvantes. Como control, se inmunizaron ratones con BV-OVAcd sin adyuvante (grupo SA) o con BV-Wt. Siete días post inmunización se sacrificaron ratones *naïve* y se procedió según el protocolo descrito en la sección Materiales y Métodos del capítulo I. La fig. R19 muestra los resultados obtenidos.

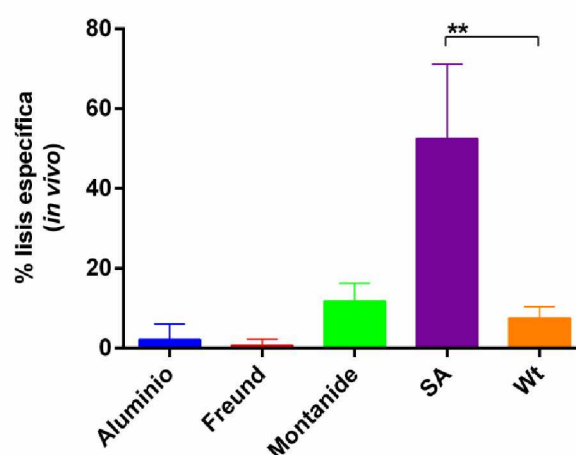


Fig. R19: Efecto de la formulación sobre la respuesta citotóxica específica. A: El porcentaje de lisis específica se calcula como $[1 - (R \text{ animal control} / R \text{ animal experimental})] \times 100$, donde $R = \% \text{ de células CFSE bajo} / \% \text{ de células CFSE alto}$. Se realizó un ANOVA con posterior aplicación del test de múltiples comparaciones Bonferroni. (**, $p < 0,01$)

Como se puede observar, todas las formulaciones ensayadas tuvieron un efecto negativo sobre la generación de la respuesta citotóxica. Sólo los animales inmunizados con el BV recombinante sin formular mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al control inmunizado con el vector Wt.

CAPÍTULO III:

ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PROTECTORA DE DIFERENTES CANDIDATOS VACUNALES PARA FMDV-A2001

Introducción

Como se describió en la introducción general, la fiebre aftosa (FA) es una enfermedad altamente contagiosa que afecta a los animales de pezuña hendida, entre ellos, bovinos, porcinos, caprinos y ovinos, ocasionando grandes pérdidas económicas. Esta virosis afecta además a más de 30 especies de animales silvestres como llamas, antílopes, ciervos y jabalíes, entre otros [110]. El impacto que genera la aparición de esta enfermedad es la razón por la cual forma parte de la lista de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y su declaración por los países y territorios miembros es obligatoria. Es la primera enfermedad para la cual la OIE ha establecido una lista oficial de países y zonas reconocidos libres con o sin vacunación. La primera vez que se identifica FA en un país o una zona, la reaparición de FA después de que el país miembro ha enviado un informe de que se han solucionado los brotes anteriores, o la primera vez que aparece en un país o una zona una nueva cepa de FMDV, constituyen eventos epidemiológicos que deben ser inmediatamente declarados ante la OIE.

El virus de la fiebre aftosa

El FMDV es el único representante del género aftovirus de la familia *Picornaviridae*. Esta familia de virus presenta una única molécula de RNA de cadena simple y polaridad positiva, incluida dentro de una cápside carente de envoltura viral y estructuralmente definida por una simetría icosaédrica, de un tamaño de 22 a 30 nm. Estos virus realizan su ciclo completo en el citoplasma de la célula infectada [111].

El FMDV comparte una organización básica similar a los otros miembros de la familia *Picornaviridae*. El genoma viral presenta un tamaño aproximado de 8200 nucleótidos [112] y la partícula infectiva tiene un diámetro de aproximadamente 23 nm [113]. La cápside icosaédrica está compuesta por sesenta copias de cada una de las cuatro proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3, y VP4). Copias únicas de cada proteína estructural se agrupan para formar un protómero; cinco protómeros se agrupan formando un pentámero, la subunidad 12S [113], que constituye cada una de las caras del icosaedro (figura I8). Doce

pentámeros constituyen la cara externa de la partícula viral [114]. El virión contiene además 1 ó 2 copias de dos proteínas minoritarias: VP0, precursor de VP2 y VP4 [115], y la polimerasa viral 3D [116].

La decapsidación de FMDV ocurre con la acidificación de los endosomas celulares. La cápside es disociada en subunidades pentaméricas, permitiendo la liberación del genoma dentro de la célula hospedadora.

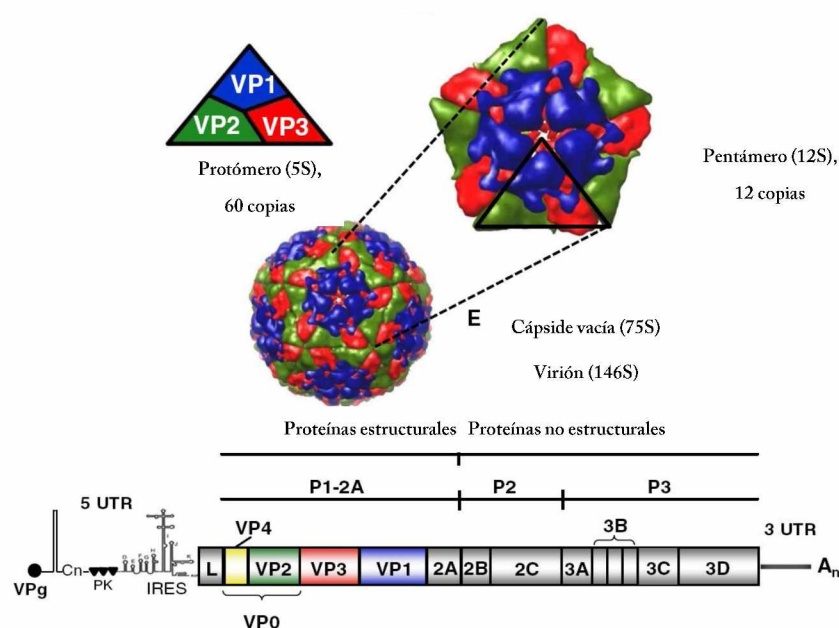


Figura I8. Estructura del virus y organización del genoma de FMDV. La región del genoma correspondiente al marco abierto de lectura se grafica como un área rectangular. Las regiones dentro del rectángulo indican las proteínas individuales. Se muestran los elementos estructurales que conforman las regiones no traducidas 5' y 3' (5' UTR y 3' UTR, respectivamente). La región 5' UTR incluye varios elementos: un segmento poli (C), Cn, 3 ó 4 pseudoknots (PK) y el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). Las partículas virales contienen una sola copia del RNA viral y están conformadas por 60 copias de las 4 proteínas de la cápside diferentes (VP1 a VP4, siendo esta última interna). Modificado de Jamal y Belsham (2013) [117]

El genoma viral

El genoma de FMDV presenta un único marco abierto de lectura, con 2 sitios alternativos de inicio de la traducción. En células infectadas se observa una fuerte preferencia del inicio de la traducción a partir del segundo AUG. Este marco de lectura está flanqueado por dos regiones más cortas no codificantes, situadas en los extremos de la molécula de RNA (extremos 5'UTR y 3'UTR), y que incluyen elementos reguladores con

complejas estructuras secundarias y terciarias [118], [119](Fig. I8). Por su polaridad positiva y la presencia de una secuencia poli(A) en el extremo terminal 3', el RNA del VFA puede ser traducido sin transcripción previa de un RNA mensajero (RNAm) complementario. Si bien el extremo 5' del genoma carece de la secuencia CAP característica de la mayor parte de los RNAm celulares y virales, está covalentemente unida a la proteína VPg [120], [121], que se encuentra codificada por 3 genes de la región P3 [115].

El RNA viral es traducido como una única poliproteína de aproximadamente 240 KDa, la cual, tras una serie de clivajes postraduccionales, da origen a más de una docena de polipéptidos maduros así como intermediarios parciales del clivaje [122], [123]. La mayoría de estos eventos proteolíticos son mediados por tres proteasas virales, Lpro, 2A^{pro}, y 3C^{pro}.

Los virus RNA se caracterizan por tener una elevada variabilidad genética debida a varios factores, entre ellos las altas tasas de error durante la replicación debido a la baja fidelidad de copia y ausencia de actividad correctora de errores de las polimerasas de RNA [124]–[126], la posibilidad de sufrir procesos de recombinación en virus de genoma no segmentado (especialmente en virus RNA de polaridad positiva) [127] y la ausencia de mecanismos celulares de reparación postreplicativa que actúan sobre DNA de doble cadena pero no sobre híbridos RNA-DNA o intermediarios replicativos de RNA bicatenarios [128]. Como consecuencia de su elevada variabilidad genética, las poblaciones de virus RNA son distribuciones dinámicas complejas de mutantes diferentes aunque estrechamente relacionadas entre sí, sometidos a un continuo proceso de variación genética, competición y selección génica, denominadas cuasiespecies virales. Dentro de las primeras demostraciones de la organización en cuasiespecies de virus RNA se encuentra la del FMDV [129].

Las cuasiespecies virales están definidas por una secuencia consenso y un espectro de mutantes. La secuencia consenso es el promedio de todos los genomas de la población y el espectro de mutantes es el conjunto de genomas que componen la población viral. Debido a la gran heterogeneidad de la cuasiespecie, la secuencia consenso puede no estar representada en el espectro de mutantes de la población. Las cuasiespecies estables suelen estar dominadas por una secuencia más frecuente en el espectro de mutantes, de mayor eficacia biológica, que se denomina secuencia maestra y que puede o no coincidir con la secuencia

consenso [130]. La evolución de las cuasiespecies víricas está dirigida por la selección positiva, que promueve la imposición de las variantes más ventajosas para un determinado entorno, por la selección negativa, que elimina o mantiene en baja proporción los mutantes menos aptos de la población, y por efectos de deriva genética, por los que una variante puede ser amplificada y llegar a ser dominante, independientemente de su eficacia biológica [131], [132].

Las proteínas estructurales

El precursor de la cápside proteica de FMDV, P1-2A, es liberado de la poliproteína por clivaje de la proteasa L en su extremo amino terminal, y por la proteasa 2A en el extremo carboxi terminal. El clivado de la poliproteína en la unión 2A/2B ocurre rápidamente, tanto dentro de la célula como en reacciones de traducción *in vitro* [133]. El precursor P1-2A es procesado por la proteasa 3C obteniéndose los productos VP0, VP3 y VP1. El empaquetado del RNA viral para generar los viriones está asociado al clivado de la proteína VP0, que da lugar a las proteínas VP4 y VP2; sin embargo, aún se desconoce el mecanismo por el que esto sucede [134]. Las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3 se ubican en la región externa de la cápside, mientras que VP4 se localiza internamente y se encuentra miristilada [135] (Fig. I8).

En el virión, el sitio de unión al receptor celular se encuentra localizado en el *loop* β G- β H de VP1, el cual además constituye el principal dominio inmunogénico del virus [136]. Este *loop* incluye una secuencia compuesta por los aminoácidos arginina-glicina-aspartato (RGD) altamente conservada. Mutaciones o deleciones en el motivo RGD afectan tanto la replicación en cultivos como la capacidad de producir enfermedad en animales [137]–[141]. La secuencia RGD es reconocida por, al menos, cuatro proteínas pertenecientes a la familia de las integrinas subgrupo α v localizadas en la superficie de diferentes tipos celulares de los animales susceptibles y de células en cultivo. Si bien el virus que infecta células en cultivo puede utilizar receptores alternativos (por ejemplo, heparán sulfato), la utilización de integrinas celulares está asociada a la capacidad de infección y a la virulencia viral *in vivo* [57]. Se ha descrito que las secuencias que rodean al motivo RGD u otras localizadas en regiones más distantes sobre la cápside viral podrían inducir cambios estructurales en el *loop*

β G- β H de VP1 y tendrían un efecto modulador en la unión del virus al receptor. Estas alteraciones podrían ocurrir con pocos cambios aminoacídicos, o tan sólo uno [142]. Sin embargo, ciertas modificaciones en la secuencia RGD son toleradas, conduciendo el proceso infectivo hacia la enfermedad en bovinos posiblemente por la vía de las integrinas [63], [143].

Se sabe que la proteína estructural VP2 tiene un rol crítico en la estabilidad estructural y en la maduración del virión [144], y que VP3 incluye epítopos conformacionales neutralizantes de importancia y contribuye a la estabilidad de la cápside [145]. VP4 es la proteína con mayor grado de conservación entre las proteínas de VFA, con un 81% de aminoácidos conservados entre los distintos serotipos, incluyendo el sitio de miristilación amino terminal y un epítopo para linfocitos T bovinos y porcinos [146].

Etapas de la patogénesis de la fiebre aftosa

El curso de la enfermedad puede dividirse en fases distintas, aunque estrechamente relacionadas: infección primaria, generalización (viremia), enfermedad clínica y persistencia viral en rumiantes. Como se mencionó anteriormente, la persistencia del virus en animales crónicamente infectados constituye un peligro sanitario.

El virus penetra en el animal generalmente por vía aérea mediante la formación de aerosoles. Normalmente son necesarias unas pocas partículas virales para iniciar la infección en la mayoría de las especies. El virus presenta tropismo por las células epiteliales localizadas en el sitio de entrada (mucosas del tracto superior respiratorio, mucosa bucal o pliegues de la piel, como por ejemplo, en el interdígito), dando lugar a unas vesículas denominadas aftas primarias que generalmente suelen pasar inadvertidas.

Tras esta primera replicación el virus pasa a sangre, produciéndose una viremia que se caracteriza por temperatura elevada y mal estar general del animal. En esta fase, FMDV producirá una segunda replicación en las células reticuloendoteliales y en el parénquima de los órganos diana (hígado, bazo, médula ósea y músculo estriado), finalmente el virus vuelve de nuevo a los lugares de predilección (células epiteliales), produciendo las vesículas secundarias características de la enfermedad, fundamentalmente en hocico y patas.

Ciclo de infección viral

Al igual que otros picornavirus, FMDV presenta un ciclo de infección corto. En cultivos celulares los nuevos viriones comienzan a detectarse entre las 4 y 6 hs postinfección, dependiendo de la multiplicidad de infección. El virus es citolítico y las células infectadas presentan alteraciones morfológicas tales como redondeamiento celular y alteración de la distribución de las membranas celulares internas, lo que constituye el efecto citopático [147].

La replicación de los picornavirus se da enteramente en el citoplasma celular. Después de la adhesión al receptor celular, el RNA es desnudado por medio de un proceso que involucra cambios estructurales en la cápside. Una vez que el RNA de polaridad positiva se libera en el citoplasma es traducido para producir las proteínas virales esenciales para la replicación y la producción de nuevas partículas virales. El primer paso en la replicación del genoma es el copiado del RNA de hebra positiva recién ingresado para formar el RNA intermediario de hebra negativa, que será utilizado para producir hebras positivas nuevas. La síntesis de RNA positivo es iniciada rápidamente por la polimerasa de RNA viral, generando hebras positivas 20 a 50 veces más rápido que las hebras negativas. Estos eventos ocurren en los denominados complejos de replicación, pequeñas vesículas derivadas de membranas que son inducidas por varias proteínas virales. A medida que se van produciendo las proteínas estructurales, 3Cpro las cliva y así se van conformando los protómeros. El inicio de la encapsidación depende de la concentración citoplasmática de proteínas estructurales. El tiempo completo requerido para un ciclo simple de replicación viral puede durar de 5 a 10 horas, dependiendo de muchas variables, entre ellas, la cepa viral, la temperatura, el pH, la célula hospedadora y la multiplicidad de infección. Las partículas de virus completas a menudo forman cristales en las células infectadas y posteriormente son liberadas por desintegración de la célula hospedadora. La mayoría de los picornavirus son liberados cuando la célula pierde su integridad y se rompe [147].

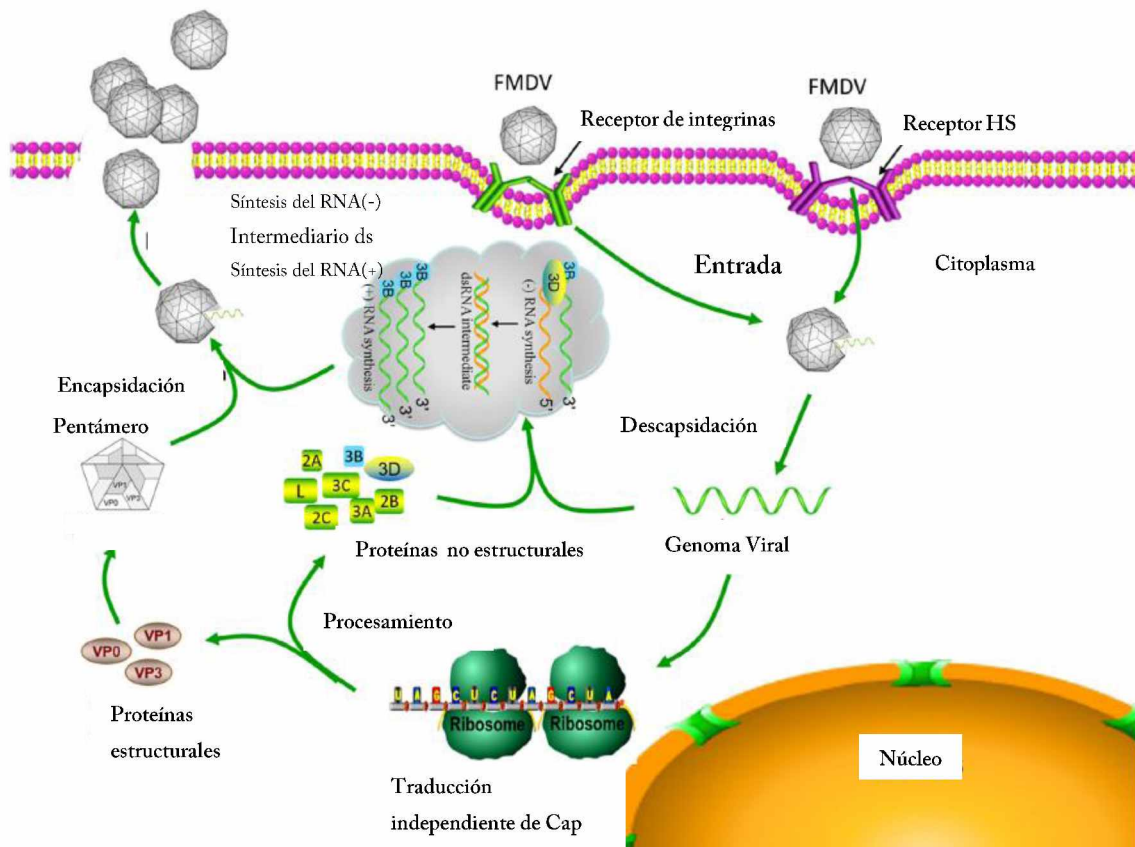


Figura I9. Ciclo de replicación. Todo el ciclo de replicación del virus ocurre en el citoplasma. El virus anula la síntesis de proteínas celulares y los RNA virales se traducen mediante un mecanismo independiente de cap. La RNA polimerasa 3Dpol dirige la síntesis del RNA viral en los denominados complejos de replicación, pequeñas vesículas derivadas de membranas que son inducidas por varias proteínas virales. A medida que se van produciendo las proteínas estructurales, 3Cpro las cliva y así se van conformando los protómeros. Modificado de Gao *et al.* (2016). [148]

Respuesta inmune frente a la infección por FMDV y control de la enfermedad

El virus desencadena una respuesta humoral rápida en animales tanto infectados como vacunados. La protección generalmente se correlaciona con altos niveles de anticuerpos neutralizantes, los cuales son detectados a partir del día 3 o 4 luego de la infección [149], [50]. Estos anticuerpos están dirigidos hacia los epitopes de proteínas estructurales exteriores, alcanzando buenos niveles de protección entre los 7 y 14 días luego de la infección o de la vacunación. En bovinos, la infección por FMDV induce inmunidad de por vida y, con el objetivo de simular la respuesta natural, se ha desarrollado una vacuna a base del virus completo inactivado y formulado con una fase oleosa, compuesta de aceite mineral y emulsificante.

El proceso de producción del virus implica la replicación en BHK de las cepas de referencia en Sudamérica -O1 Campos y A24 Cruzeiro-, las última cepa de campo de tipo A circulante en la Argentina (A/Argentina/2001) y la cepa C3 Indaial. El virus es inactivado empleando etilenimina binaria (BEI), luego de lo cual se realiza la purificación y concentración mediante el uso de polietilenglicol (PEG), lo que permite la obtención de virus libre de otras sustancias remanentes del proceso de producción. Finalmente se realiza una formulación con la fase oleosa, compuesta de aceite mineral y emulsificante, sustancias inocuas para el animal y para consumo humano. Además de los controles internos desarrollados por el personal de Control de Calidad, el SENASA realiza auditorías permanentes y toma muestras de los distintos procesos para evaluarlos de acuerdo con lo establecido en las normativas vigentes.

Si bien la introducción de esta vacuna ha resultado fundamental en el proceso de control, reduciendo el número de brotes en varias partes del mundo donde la enfermedad era considerada enzoótica, induce inmunidad por períodos de hasta sólo 6 meses [150], por lo que es necesario aplicar esquemas de vacunación de dos dosis anuales. Además, los animales inmunizados contra un serotipo carecen de anticuerpos protectores contra otros serotipos del virus [151]. Inclusive, pueden tener una pobre respuesta inmune si se trata de 2 subtipos pertenecientes al mismo serotipo pero muy diferentes entre sí. Por otro lado, existe una serie de consideraciones y limitaciones con respecto a su uso en programas de control donde la enfermedad ha sido erradicada o está en vías de serlo [151]:

- Se requieren instalaciones de bioseguridad de nivel 3 para la producción de la vacuna.
- La mayoría de las preparaciones virales utilizadas para vacunas provienen de sobrenadantes de cultivo concentrados a partir de células infectadas con FMDV. Esto constituye una dificultad para el fabricante, quien debe minimizar la cantidad de proteínas virales no estructurales contaminantes para que los animales vacunados no desarrollen anticuerpos contra estas proteínas, lo que dificultaría distinguir animales vacunados de infectados o convalecientes en las pruebas diagnósticas.

- La vacuna induce un estado de protección a los 7 días postvacunación. Por lo tanto, los animales vacunados presentan un período ventana de susceptibilidad previo a la inducción de la respuesta inmune adaptativa.
- Los animales vacunados pueden convertirse en portadores luego del contacto con FMDV infeccioso.

Algunas de estas consideraciones se han tenido en cuenta para el desarrollo de nuevas vacunas que no requieren virus infeccioso [48]. Además, el creciente entendimiento del rol de la respuesta inmune innata frente a la infección por FMDV ha permitido comenzar a desarrollar estrategias antivirales que utilizan varias citoquinas para inducir protección y para potenciar la respuesta inmune [48]. Por otro lado, se ha observado la existencia de protección en casos donde los niveles de dichos anticuerpos son bajos o indetectables [152]. Como ya mencionamos, el rol de la respuesta celular aún no ha sido dilucidado completamente, pero se ha sugerido que la inmunidad celular estaría involucrada en la eliminación del virus en los animales infectados de manera persistente [153]. La inducción de anticuerpos contra FMDV se correlaciona con una respuesta linfoproliferativa en bovinos y porcinos [154], [155] y es dependiente de células T en ratones [156]. Adicionalmente, se ha visto que los cerdos desarrollan una linfopenia severa pero transitoria durante la fase aguda de la infección. Todas las poblaciones de células T, así como las células B, se encuentran afectadas, y la disminución del número de linfocitos se correlaciona con la aparición de viremia [157], [158]. Sin embargo, la funcionalidad y el número de linfocitos comienzan a retornar a sus niveles normales 4 a 7 días luego de la infección, cuando la viremia decae. Estos resultados sugieren que los linfocitos poseen un rol en la protección frente al virus y que la reducción en el número y función de los linfocitos T promueve la patogénesis viral al facilitar la diseminación viral. Por otro lado, en los últimos años se ha incrementado el interés por el rol que cumple la respuesta inmune innata en la vacunación y en la infección por FMDV.

En particular, nuestro grupo de trabajo ha realizado también contribuciones al conocimiento de los distintos factores involucrados en la respuesta inmune de hospedadores naturales contra el FMDV. Así, hemos demostrado en diferentes ensayos con un número

elevado de animales que la inmunización con péptidos sintéticos no sólo despertó una limitada protección sino que además la presión inmunológica seleccionó en algunos animales no protegidos variantes virales que escaparon a la neutralización [63]. Entre otros, algunos virus seleccionados mostraron alteraciones en el motivo RGD de unión al receptor, confirmando la posibilidad de que FMDV es capaz de infectar células empleando receptores celulares alternativos. Mediante pasajes seriados de diferentes mutantes bajo diferentes condiciones de presión de selección inmune se obtuvieron resultados que sugieren que esta presión de selección puede jugar un rol importante tanto en la selección como en la estabilidad de las variantes antigénicas y que estas variantes pueden manifestar alteraciones en el tropismo celular [63].

Por otro lado, hemos demostrado también que la inyección de baculovirus brotados en ratones de la cepa C57BL/6J previene completamente el desarrollo de signos que el virus de la fiebre aftosa produce en este modelo animal, entre las 3 hs y los 3 días post inyección, presumiblemente en base a la inducción de un complejo estado de activación de mecanismos del sistema inmune innato [45]. Así, *AcMNPV* podría convertirse en una muy poderosa herramienta para mejorar el diseño de vacunas de nueva generación que protejan hospedadores susceptibles a tiempos cortos post inoculación, cubriendo el período de ventana entre la vacunación y la aparición de los primeros efectores de la respuesta inmune adaptativa.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los capítulos I y II y los hallazgos previos de nuestro grupo, el último capítulo de esta tesis se enfocó en el diseño y evaluación de BV recombinantes que transporten antígenos del FMDV A/Arg/2001, a la vez que confieren un estado antiviral inespecífico que pueda tener importancia a tiempos tempranos pos vacunación.

Objetivos específicos

Seleccionar los sitios antigénicos del FMDV serotipo A2001 capaces de despertar una respuesta humoral y aquellos capaces de generar una respuesta celular citotóxica, tras su incorporación en vectores baculovirales.

Construir y caracterizar el conjunto de baculovirus recombinantes BV-FMDV que transporten una proteína multiepitópica contiendo epitopes B relevantes de las proteínas estructurales en su superficie y epítopes T CD8 su nucleocápside.

Caracterizar y comparar las respuestas inmunes, tanto humoral como celular, obtenidas en modelos murinos.

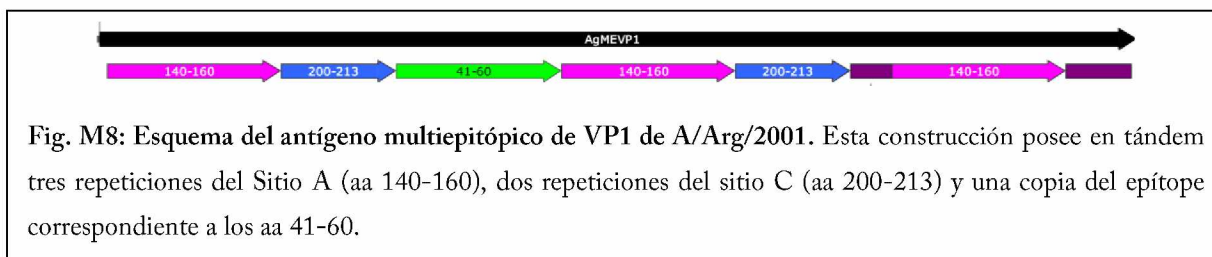
Evaluar la capacidad protectora del BV-FMDV en un experimento de desafío letal en el modelo murino empleando C57Bl/6.

Materiales y Métodos

Producción y caracterización de BV-FMDV

Selección de los antígenos

En el capítulo I se demostró que la presentación en la superficie del virión brotado favorece la generación de anticuerpos, mientras que la expresión de una proteína heteróloga como fusión a VP39 es la estrategia más efectiva para montar una respuesta celular citotóxica. Por otro lado, ya fue mencionada la importancia de la generación de anticuerpos neutralizantes dirigidos principalmente al sitio A, así como el aporte de los anticuerpos dirigidos contra el sitio C y contra otros epítopes B (como el comprendido entre los aa 41-60 de VP1). Considerando también los antecedentes exitosos de expresión en tándem de sitios antigénicos, se diseñó un antígeno multiepitópico (AgME) que contiene tres copias del sitio A, dos copias del sitio C, y una copia de la secuencia correspondiente a los aa 41 a 60. La figura a continuación muestra un esquema del AgME. La secuencia nucleotídica y aminoacídica completa se encuentra en los anexos.



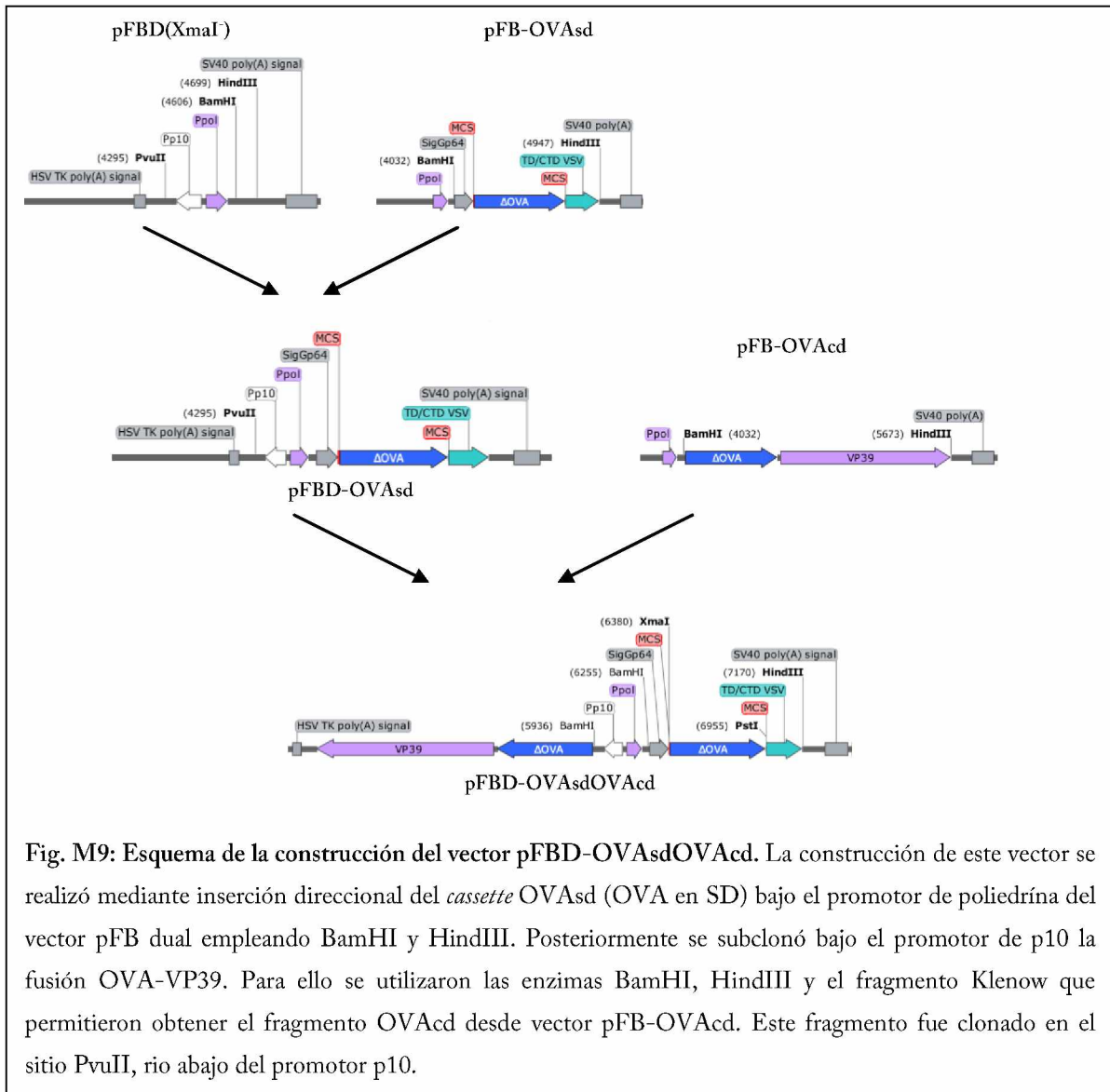
Si bien la presencia de anticuerpos neutralizantes permite la opsonización del virus circulante impidiendo la propagación de la infección, también debe ser considerada la eliminación de las células infectadas al inicio de la infección o incluso en infecciones crónicas o persistentes. Dichas células presentan en su superficie péptidos derivados de todas las proteínas virales que se sintetizan *de novo* en moléculas del CMH-I de clase I. Debido a que las proteínas virales se originan de una única poliproteína, en un ciclo de infección se sintetizan igual cantidad de moléculas de todas las proteínas virales y por tanto, la distribución de péptidos presentados en la superficie de la célula será representativa de

todas ellas. Sin embargo, si consideramos que una célula dendrítica incorpora un virión, procesa sus proteínas y presenta los péptidos derivados de las mismas, la cantidad de epitopes derivados de proteínas de la cápside será muy superior a los derivados de las proteínas no estructurales. Asimismo, debido a que no hay reportes previos de péptidos de clase I en proteínas estructurales del serotipo A2001 y los reportados para otros serotipos no se encuentran presentes, se realizó un análisis *in silico* de las secuencias de las proteínas estructurales de la cápside de A2001 utilizando el predictor ProPred-I (<http://crdd.osdd.net/raghava/propred1/>). Los parámetros de análisis se seleccionaron considerando que el modelo de desafío utiliza ratones C57BL/6/J (CMH-I alelo H2-Kb) y como valores de corte, los más exigentes (se analizó la secuencia de OVA como control). La proteína VP2, cuyo análisis arrojó péptidos putativos con mejores *scores*, fue la seleccionada para su expresión como fusión a VP39.

Construcción de los vectores de transferencia

Para la obtención de los BV transportando los antígenos de aftosa seleccionados, se utilizó como base el vector de transferencia comercial pFastBacDual que permite la expresión de dos construcciones en forma independiente. Este vector contiene un sitio de reconocimiento para la enzima XmaI que debió ser eliminado en primer lugar. Para ello se realizó una digestión con la enzima XmaI, seguida del rellenado de los extremos cohesivos y ligación posterior. Se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α y la selección se realizó en placas de LB-agar-Gentamicina. Se picaron varias colonias y crecieron en medio líquido y las minipreparaciones de DNA fueron caracterizadas por restricción utilizando las enzimas XmaI y SpeI para verificar la anulación del sitio de corte. Los clones también fueron caracterizados por doble digestión utilizando las enzimas XmaI y SpeI, digestión que permitía la liberación de una banda de 337 pb en los clones que aún mantenían el sitio XmaI. El vector dual con el sitio XmaI anulado fue utilizado como vector base para las construcciones subsiguientes. El primer inserto clonado en forma direccional fue el *cassette* OVAsd bajo el promotor de poliedrina, que se obtuvo por digestión utilizando las enzimas BamHI y HindIII del vector pFB-OVAsd previamente construido. A continuación, se insertó en el sitio PvuII río abajo del promotor de p10 el *cassette* OVAcD obtenido por

digestión con BamHI y HindIII y posterior tratamiento con el fragmento Klenow de la DNA Pol I a partir del vector pFB-OVAcd. La figura M9 muestra un esquema de la generación de este vector doble OVA denominado pFBD-OVAcdOVAcd. El mapa completo de este vector se encuentra en los anexos.



Por otro lado se solicitó la síntesis (IDT – Biodynamics) de la secuencia nucleotídica denominada AgME de VP1-A2001 y su clonado en un plásmido con resistencia a kanamicina para su selección en bacterias. El plásmido denominado pIDT-AgME contiene además el sitio XmaI en el extremo 5' y el sitio PstI en el extremo 3' que permiten el

clonado en marco de esta secuencia dentro del *cassette* SD. La secuencia del AgME y el mapa del vector pIDT que lo contiene se encuentran en los anexos.

Por digestión del vector pFB-OVAsdOVAcd utilizando XmaI y PstI se liberó el fragmento OVA del *cassette* SD. El vector pIDT-AgME fue digerido con las mismas enzimas. Los productos se resolvieron en gel de agarosa y las bandas correspondientes a vector e inserto fueron purificadas y utilizadas para realizar el ligado. La figura M10 muestra un esquema de la generación del vector denominado pFBD-AgMEsdOVAcd.

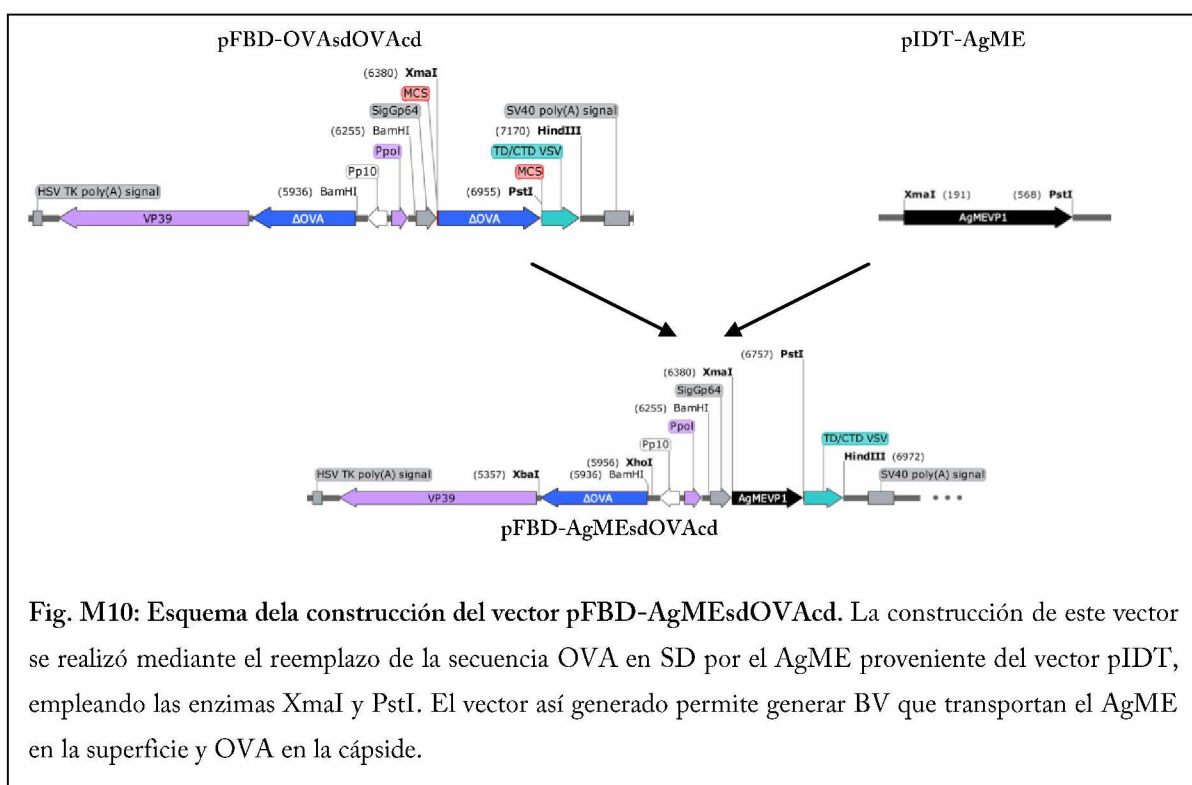


Fig. M10: Esquema de la construcción del vector pFBD-AgMEsdOVAcd. La construcción de este vector se realizó mediante el reemplazo de la secuencia OVA en SD por el AgME proveniente del vector pIDT, empleando las enzimas XmaI y PstI. El vector así generado permite generar BV que transportan el AgME en la superficie y OVA en la cápside.

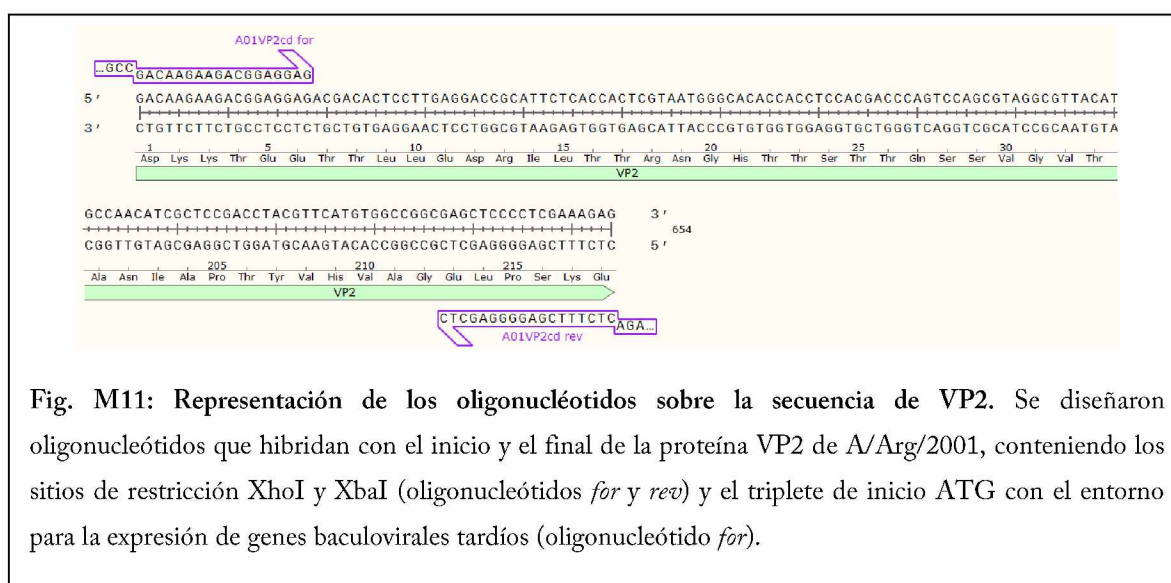
Para la construcción del vector que posee VP2 en la cápside se partió de un vector gentilmente cedido por la Dra. García Nuñez [159] y que corresponde a un intermediario de la construcción del clon infeccioso de A/Arg/2001. En primer lugar se amplificó por PCR de alta fidelidad la secuencia VP2 utilizando oligonucleótidos (denominados A01VP2cd *for* y *rev*) que permitieran incorporar el sitio XhoI y la secuencia consenso para una óptima traducción en el sistema en el extremo 5' (ANYATGNY) y el sitio XbaI en el extremo 3'. Estos sitios de restricción permitieron luego el reemplazo de la secuencia OVA

en el *cassette* OVAcd por la secuencia de VP2 respetando el marco de lectura que permite su expresión como proteína de fusión a VP39.

A01VP2cd *for*: ACTCGAGAAATATGGCCGACAAGAAGACGGAGGAG

A01VP2cd *rev*: ATCTAGACTCTTTCGAGGGGAGCTC

La figura a continuación esquematiza la hibridación de los oligonucleótidos en el sobre la secuencia de VP2 de A2001 contenida en el vector de partida.



El producto de la PCR fue purificado del gel y se ligó con el vector TOPO utilizando el kit comercial *TOPO TA Cloning Kit* (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las especificaciones del fabricante. Se transformaron bacterias DH5α que fueron plaqueadas en medio LB-agar en presencia de Kanamicina y X-Gal. Se seleccionaron las colonias blancas y se analizó mediante digestión con enzimas de restricción la identidad de las mismas que luego fue confirmada por secuenciación. El vector TOPO-VP2cd así generado y los vectores pFBD-OVAcdOVAcd y pFBD-AgMEcdOVAcd fueron digeridos usando las enzimas XhoI y XbaI, resueltos en gel de agarosa y las bandas correspondientes a inserto y vectores respectivamente fueron purificadas y ligadas. Se transformaron bacterias *E. coli* DH5α y la selección se realizó en placas LB-agar-Gentamicina. Los clones obtenidos se caracterizaron por digestión con enzimas de restricción. A continuación se esquematiza la

construcción del vector pFBD-AgMEsdVP2cd (figura M12) y del vector pFBD-OVAsdVP2cd (figura M13).

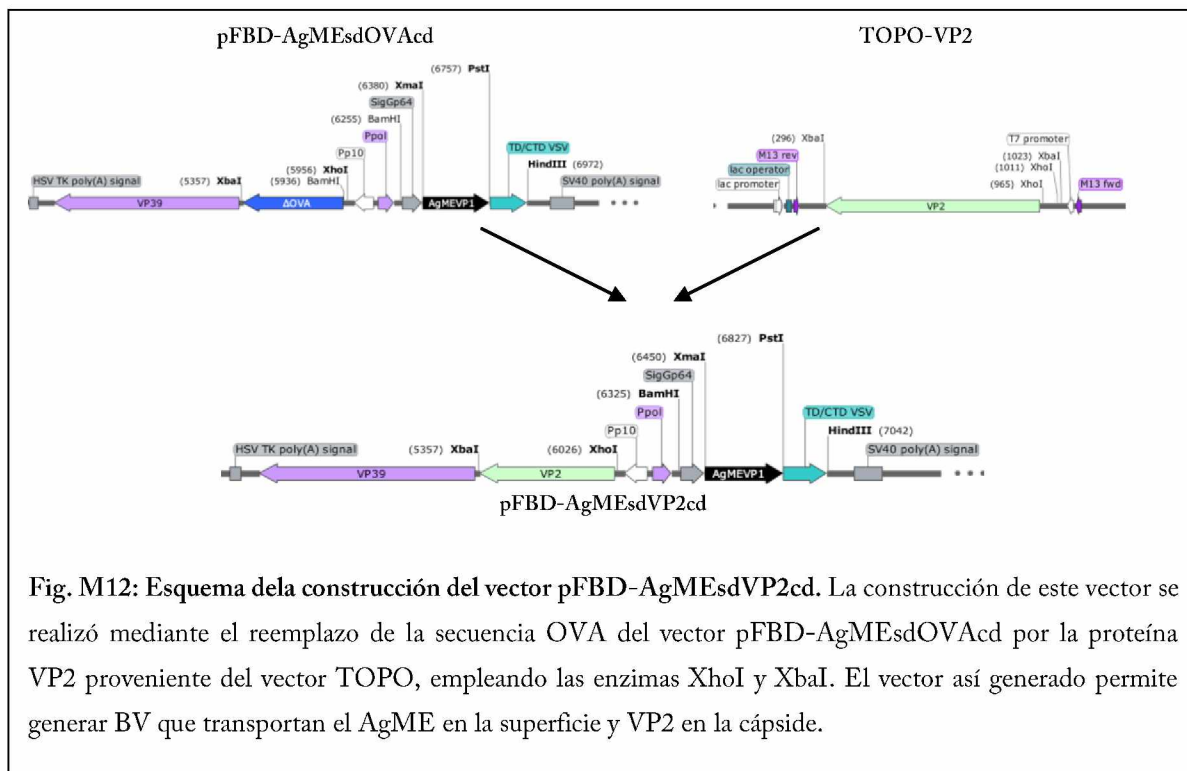


Fig. M12: Esquema de la construcción del vector pFBD-AgMEsdVP2cd. La construcción de este vector se realizó mediante el reemplazo de la secuencia OVA del vector pFBD-AgMEsdOVAcd por la proteína VP2 proveniente del vector TOPO, empleando las enzimas XhoI y XbaI. El vector así generado permite generar BV que transportan el AgME en la superficie y VP2 en la cápside.

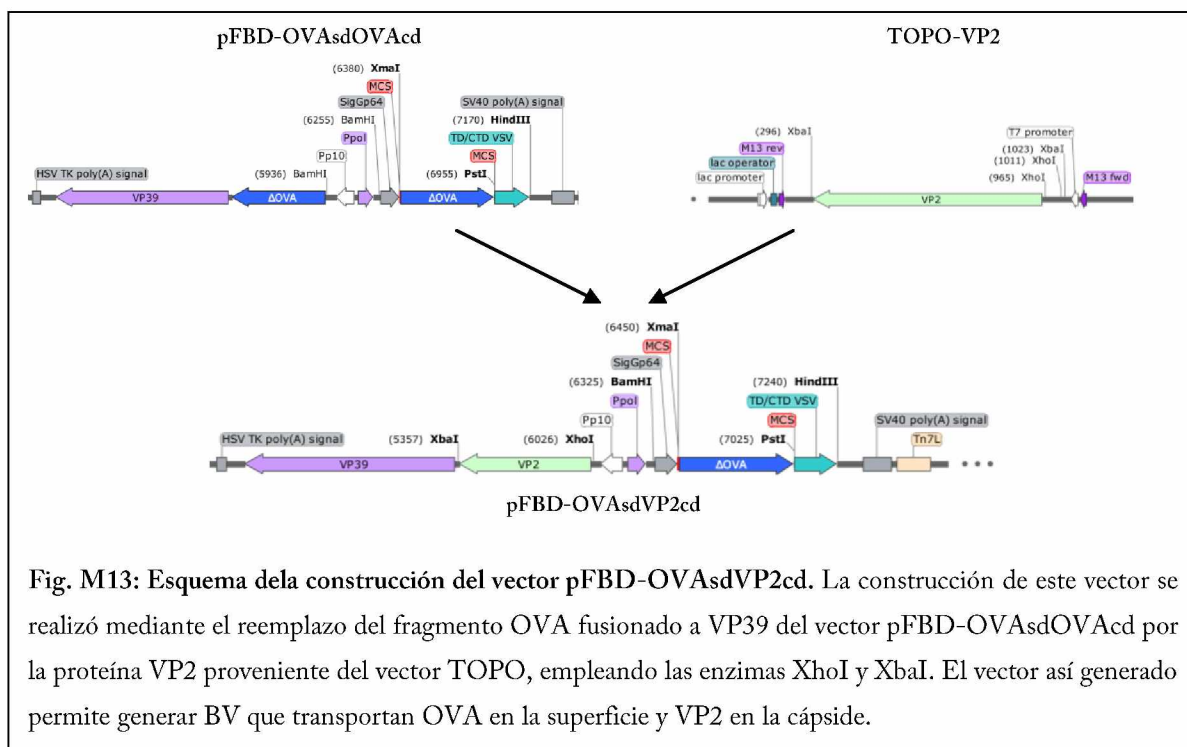


Fig. M13: Esquema de la construcción del vector pFBD-OVAsdVP2cd. La construcción de este vector se realizó mediante el reemplazo del fragmento OVA fusionado a VP39 del vector pFBD-OVAsdOVAcd por la proteína VP2 proveniente del vector TOPO, empleando las enzimas XhoI y XbaI. El vector así generado permite generar BV que transportan OVA en la superficie y VP2 en la cápside.

Obtención y caracterización de los BV-FMDV

La obtención de los bácmidos mediante el sistema Bac-to-Bac y la generación de *stocks* virales se realizaron siguiendo el procedimiento descrito en materiales y métodos generales. Brevemente, se utilizó 1 µg de DNA de cada bácmido seleccionado para transfectar células Sf9 sembradas en placas de seis pocillos a una densidad de 8×10^5 células/pocillo. 4 a 6 días postransfección los sobrenadantes fueron cosechados, clarificados por centrifugación y titulados por dilución a punto final utilizando una línea Sf9-GFP, que posee GFP bajo promotor de poliedrina. Los títulos obtenidos fueron variables entre 1×10^6 y 1×10^8 ufp/ml. Para aumentar el título y el volumen de los *stocks* virales se realizaron dos o tres pasajes por células Sf9 crecidas en monocapa. La caracterización de los BV-FMDV recombinantes se realizó por inmunomicroscopía de fluorescencia de células Sf9 infectadas y *Western blot* utilizando pasajes virales con títulos iguales o superiores a 1×10^8 ufp/ml.

Caracterización por inmunomicroscopía de fluorescencia

Para evaluar la expresión y localización celular del antígeno modelo en las diferentes construcciones se realizaron inmunomicroscopías de fluorescencia de células Sf9 infectadas con BV-AgMEsd, BV-VP2cd y BV-OVA como control. Se utilizó el protocolo descrito para la caracterización de los BV construidos en el capítulo I de esta tesis, pero en este caso se utilizó como anticuerpo primario el suero policlonal de conejo anti A-2001 en una dilución 1:1000 gentilmente provisto por el laboratorio del Dr. Pérez Filgueira del Instituto de Virología del INTA Castelar. El paso de permeabilización no se realizó en las células infectadas con el BV-AgMEsd.

Caracterización por *Western blot*

Para evaluar si los viriones brotados efectivamente incorporaron los antígenos heterólogos, se concentraron muestras de 2 ml de segundos pasajes de las diferentes construcciones por centrifugación a $80.000 \times g$ a 4°C durante 1 h y se resuspendieron en 20 µl de *cracking buffer* 1X (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, glicerol 10 %, SDS 2 %, 2-mercaptoetanol 100 mM, azul de bromofenol 0,025 %). Las muestras se hirvieron por 10 min, se resolvieron por SDS-PAGE y se analizaron por *Western blot*.

La confirmación de la localización de los diferentes antígenos en la partícula viral se realizó también por *Western blot* utilizando muestras pretratadas con *buffer* de lisis (NaCl 150 mM, Tris pH 8.0 50 mM, Triton X-100 1%) o la misma solución sin Triton, tal como se describió en la sección de materiales y métodos del capítulo I.

Determinación de la respuesta humoral específica contra A2001

Para estos experimentos se utilizaron ratones hembra Balb/c de 6 semanas de edad al inicio del experimento. La inmunización se realizó vía i.p. utilizando agujas de 25 G. La dosis inoculada fue de 1×10^8 ufp y el volumen nunca superó los 1000 μ l. Los inmunógenos a ensayar fueron *stocks* virales titulados y caracterizados por *Western blot* del BV que porta el antígeno multiepitópico en la superficie y el BV control OVA. Se inocularon 3 dosis, una cada 15 a 18 días. Las muestras de suero fueron tomadas el día anterior a cada inmunización. Como control positivo se utilizó un grupo de ratones que recibió una única dosis de la vacuna comercial tetravalente formulada (Bioaftogen®, Biogénesis-Bagó).

Determinación de anticuerpos totales

La determinación de anticuerpos totales anti A2001 en las muestras de los sueros de ratón fue realizada por ELISA de captura indirecto y por *Western blot*.

Determinación de anticuerpos totales por ELISA de captura

Para ello se sensibilizaron a 4 °C durante toda la noche placas de 96 pocillos fondo plano (H2B Maxisorp, NUNC) utilizando 50 μ l por pocillo de una dilución 1:2000 del suero policlonal de conejo anti-A2001 en *buffer* carbonato/bicarbonato de sodio pH 9,6. Luego de lavar con 300 μ l de PBS-T (PBS 1 X, Tween 20 0,05 %) se realizó el bloqueo por agregado de 100 μ l de PBS-SNE (PBS- Suero Normal Equino 10%) e incubación en cámara húmeda durante 1 h a 37 °C. Finalizado el bloqueo, se lavaron las placas y se agregaron cápsides purificadas de A2001 (30 ng por pocillo) diluidas en solución de bloqueo. Luego de incubar 1 h a 37 °C, se lavaron las placas 3 veces y se agregaron diluciones 1/25 de los sueros incógnitas y de los sueros previos a la inmunización. Cada determinación se realizó por duplicado. Asimismo, se analizó una dilución 1/200 del *pool* de

sueros de los animales inmunizados con la vacuna comercial. Las placas fueron incubadas en las condiciones descriptas anteriormente y lavadas 3 veces con PBS-T. Como anticuerpo secundario se utilizó una dilución 1:2.500 de un anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con la enzima peroxidasa (AXELL). Finalmente, se realizaron 3 lavados y se utilizó como sustrato 50 μ l de la solución comercial *TMB Substrate Reagent Set* (BD Pharmingen). La reacción se detuvo por agregado de 25 μ l H_2SO_4 2 N y las placas fueron leídas a 450 nm.

Determinación de anticuerpos totales por *Western blot*

Se realizó un SDS-PAGE utilizando 300 ng por calle de cápsides purificadas por gradiente de cloruro de cesio gentilmente provistas por el laboratorio del Dr. Pérez Filgueira. Como anticuerpos primarios se utilizaron diluciones 1:25 de sueros de los ratones Balb/c inmunizados con las diferentes construcciones ensayadas. Se emplearon los materiales ya descriptos para la realización de otras caracterizaciones por *Western blot* pero en este caso se reemplazo el TBS por PBS.

Determinación del aporte de la presencia de VP2 en la cápside a la protección

Se utilizó un experimento de desafío utilizando una dosis única de BV para evaluar el aporte de la respuesta citotóxica contra VP2 a la protección frente a un desafío letal. Se utilizaron ratones hembra C57BL/6J de 8 semanas de edad al inicio del experimento. La inmunización se realizó vía i.p. utilizando agujas 25 G. La dosis fue de 2×10^8 ufp y el volumen inoculado nunca superó los 1000 μ l. Los inmunógenos a ensayar fueron *stocks* virales titulados y caracterizados por *Western blot* del BV que porta VP2 en la cápside y el BV control OVA.

Experimentos de desafío con A/Arg/2001 en el modelo ratón

Se utilizó como modelo de evaluación el desarrollado por el grupo de Salguero y col.[160]. Este modelo imita en parte el curso de la infección de FMDV en el hospedador natural, permitiendo evaluar varios aspectos de la patogenicidad. Diversos grupos de investigación, incluido el nuestro, han utilizado ampliamente este modelo [45], [86], [161].

En todos los casos se utilizaron grupos de 6 ratones hembra C57BL/6J de 9 semanas de edad al día del desafío. La inmunización se realizó vía i.p. utilizando agujas de 25 G. La dosis inoculada fue de 1×10^8 a 1×10^9 ufp según el experimento. Los inmunógenos a ensayar fueron *stocks* virales titulados y caracterizados por *Western blot*. En los experimentos donde se utilizaron dosis más elevadas (1×10^9) los virus clarificados se concentraron por ultracentrifugación. Como control positivo 200 μ l (equivalente a 0,1 μ g de antígeno) de la vacuna comercial tetravalente formulada (Bioaftogen®, Biogénesis-Bagó). Se realizaron 1 o 2 dosis de BV según el experimento. En todos los casos la última dosis se realizó a las 8 semanas de vida y una semana después los ratones fueron desafiados por inoculación vía i.p. de $1,5 \times 10^4$ ufp de FMDV (A/Arg/2001) en un volumen final de 200 μ l. El procedimiento se realizó dentro del laboratorio de bioseguridad NBS-3A OIE del Instituto de Virología de INTA, Castelar. Estos experimentos fueron realizados en colaboración con el grupo de la Dra. Gismondi.

Sobrevida

Luego del desafío, los animales fueron mantenidos en el bioterio del laboratorio de bioseguridad y monitoreados diariamente. Se evaluó el estado general del animal teniendo en cuenta signos clínicos (respiración, temblores), apariencia física (piloerección, posturas indicativas de dolor, decaimiento) y respuesta a estímulos externos (movimiento al tacto). Aquellos animales con alteraciones clínicas que alcanzaron el criterio de punto final fueron eutanasiados. Se contabilizaron diariamente los ratones que murieron o debieron ser sacrificados y se construyó la curva de sobrevida correspondiente.

Resultados

Obtención y caracterización de los BV-FMDV

Selección de los antígenos

Para la construcción de los BV-FMDV se seleccionaron dos antígenos derivados de proteínas estructurales del FMDV A/Arg/2001, última cepa de campo circulante en nuestro país y representante de serotipo en la vacuna comercial actualmente empleada. Teniendo en cuenta los resultados del capítulo I, en el que se determinó que los epítopes B generan la máxima respuesta humoral cuando son expuestos en alta densidad en toda la superficie del virión brotado, mientras que la mayor respuesta citotóxica generada contra epítopes T se logra mediante la presentación en cápside, el antígeno a ser transportado en la superficie del virión brotado contendrá los epítopes más relevantes ya descritos y caracterizados en dicha cepa. Considerando también los antecedentes exitosos de expresión en tándem de sitios antígenicos [162], se diseñó un antígeno multiepitópico (AgME) que contiene tres copias del Sitio A (aa 14 a 160 de VP1), dos copias del Sitio C (aa 200 a 213 de VP1) y una copia de los de aa 41 a 60 de VP1. La figura a continuación muestra un esquema del AgME cuya síntesis fue solicitada a IDT – Biodynamics. La secuencia nucleotídica y aminoacídica completa se encuentra en los anexos.

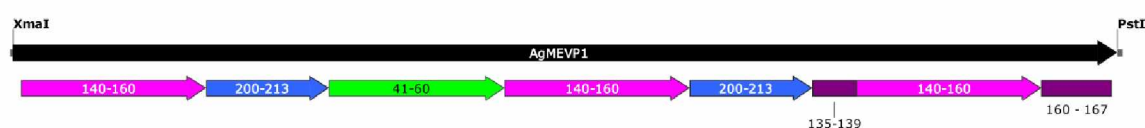


Fig. R20: Esquema del antígeno multiepitópico de VP1 de A/Arg/2001. Esta construcción posee en tándem tres repeticiones del Sitio A (aa 140-160), dos repeticiones del sitio C (aa 200-213) y una copia del epítipo correspondiente a los aa 41-60. La secuencia codificante de este antígeno multiepitópico posee los sitios únicos XmaI y PstI al inicio y final respectivamente, lo que permite su inserción direccional en el sitio de clonado del *cassette* SD.

Por otro lado, a fin de montar una respuesta citotóxica que permita eliminar las células infectadas con el FMDV, se procedió a seleccionar un antígeno que será presentado en la cápside de los BV. Debido a que no hay reportes previos de péptidos de clase I del serotipo

A2001 y los reportados para otros serotipos no se encuentran presentes, se realizó un análisis *in silico* de las secuencias de las proteínas estructurales de la cápside de A2001 utilizando el predictor ProPred-I (<http://crdd.osdd.net/raghava/propred1/>). Los parámetros de análisis se seleccionaron considerando el modelo animal de ratones C57BL/6J (CMH-I alelo H2-Kb) y, como valores de corte, los más exigentes (se analizó la secuencia de OVA como validación). La figura a continuación muestra los resultados obtenidos del análisis de la secuencias de las cuatro proteínas de cápside de A/Arg/2001. En base a los parámetros analizados, la proteína VP2 fue la seleccionada para su fusión a VP39.

A

VP1:

DQEPLNGEWKAKVQRKLKGAGQSSPATGSQNQSGNTGS
I INNYMQQYQNSMDTQLGDNAISGGSNEGSTDTTSTH
TTNTQNNDFWSRLASSAFSGLFGALLA

ALLELE: MHC-Kb				
Analysis at 1 % threshold [Numerical Value = 1.792]				
Rank	Sequence	Peptide Position	Peptide Score	Binder/Non-Binder
1	QNNDFWSRL	80	14.400	Predicted Binder
2	YMQYQNSM	43	3.600	Predicted Binder
3	YMQYQNS	42	2.400	Predicted Binder

B

VP2:

DKKTEETTLLEDRIILTRNGHTTSTTQSSVGVITYGYSTTE
DHVAGPNTSGLETRVVQAEFYKFLFDWTTDKPFGHLHK
LELPTDHYGVFGHLVDSYAYMRNGWDVEVSAVGNQFNGGC
LLVAMVPEWKEFETREKYQLTLFPHQFISPTNMTAHTV
PYLSAADYATASDEATTNVQGWVCVYQITHGKDNADTV
ANIAPTYVHVAGELPSKE

ALLELE: MHC-Kb				
Analysis at 1 % threshold [Numerical Value = 1.792]				
Rank	Sequence	Peptide Position	Peptide Score	Binder/Non-Binder
1	DHYGVFGHL	85	50.000	Predicted Binder
2	HLVDSYAYM	92	24.000	Predicted Binder
3	AQIKVYANI	194	7.920	Predicted Binder
4	GNQFNGGCL	112	3.600	Predicted Binder

C

VP3:

GIFPVACADGYGGLVTTDPKTADPAYGKVINPRTNYPGR
FTNLLDVAEACPTFLCFDDGKPYVTTQTGESRLLAKFDLS
LAAKHSNTYLAGIAQYYTQYSGTINLHFMFTGSTDSKAR
YVAYIPPGVETPPDTPERAHCIAEWDTGLNSKFTFSI
PYVSAADYATASDEATTNVQGWVCVYQITHGKDNADTV
VVSVSAGKDFELRLPIDPRPQ

ALLELE: MHC-Kb				
Analysis at 1 % threshold [Numerical Value = 1.792]				
Rank	Sequence	Peptide Position	Peptide Score	Binder/Non-Binder
1	NYPGRFTNL	35	30.000	Predicted Binder
2	ACADGYGGL	5	26.400	Predicted Binder
3	QYYTQYSGT	95	12.000	Predicted Binder
4	TQYSGTINL	98	10.000	Predicted Binder

D

VP4:

TTATGESADPVTTTVENYGGGTQVQRRHHTDVGFIIMDRF
VKINSPKSTHVIDLMQTHQHGLVGLALRAATYYFSDLEI
VVRHDGNLTWVPNGAPVSALSNTSNPTAYNKAPFTRLAL
PYTAPHRVLATVYNGTSKYTVSGSSRRGDLGSLAARVAK
ALPASFNYGAIKDNVHELLVRMKRAELYCPRLLALEV
ISQDRHKQKIIAPEKQ

ALLELE: MHC-Kb				
Analysis at 1 % threshold [Numerical Value = 1.792]				
Rank	Sequence	Peptide Position	Peptide Score	Binder/Non-Binder
1	SNPTAYNKA	101	11.405	Predicted Binder
2	AATYYFSDL	67	11.000	Predicted Binder
3	FIMDRFVKI	33	4.320	Predicted Binder
4	LMQTHQHGL	52	3.960	Predicted Binder

Fig. R21: Resultados del análisis de las proteínas de cápside de A/Arg/2001. Los parámetros utilizados contemplaron el modelo animal empleado (alelo H2-Kb) y la exigencia del análisis fue la máxima permitida (1% threshold). Se realizó una validación mediante el análisis de la secuencia de la proteína OVA. Panel A, B, C y D: Análisis de VP1, VP2, VP3 y VP4 respectivamente. Subrayado sobre cada secuencia se encuentran los péptidos predichos por el análisis

Construcción de los vectores de transferencia duales

Se construyeron los vectores de transferencia que permitieron la expresión de antígenos de FMDV serotipo A/Arg/2001 utilizando las estrategias de presentación antigénica seleccionadas en el capítulo I:

- Antígeno multiepitópico de VP1 en el *cassette* SD. El BV recombinante presenta en toda su superficie este multiantígeno que contiene los epitopes B más importantes involucrados en la generación de respuesta humoral neutralizante contra el virus de la fiebre aftosa.
- VP2 fusionada a VP39. Las cápsides recombinantes están compuestas por la versión salvaje y la versión recombinante de la proteína VP39, lo que permitirá la presentación de los péptidos de clase I putativos de VP2 encontrados mediante análisis bioinformático.
- OVA, como antígeno no relacionado y control negativo.

Los vectores de transferencia finales fueron caracterizados utilizando mapeo con enzimas de restricción. La figura a continuación muestra los patrones esperados y obtenidos para cada construcción. Las flechas indican el clon seleccionado de cada vector.

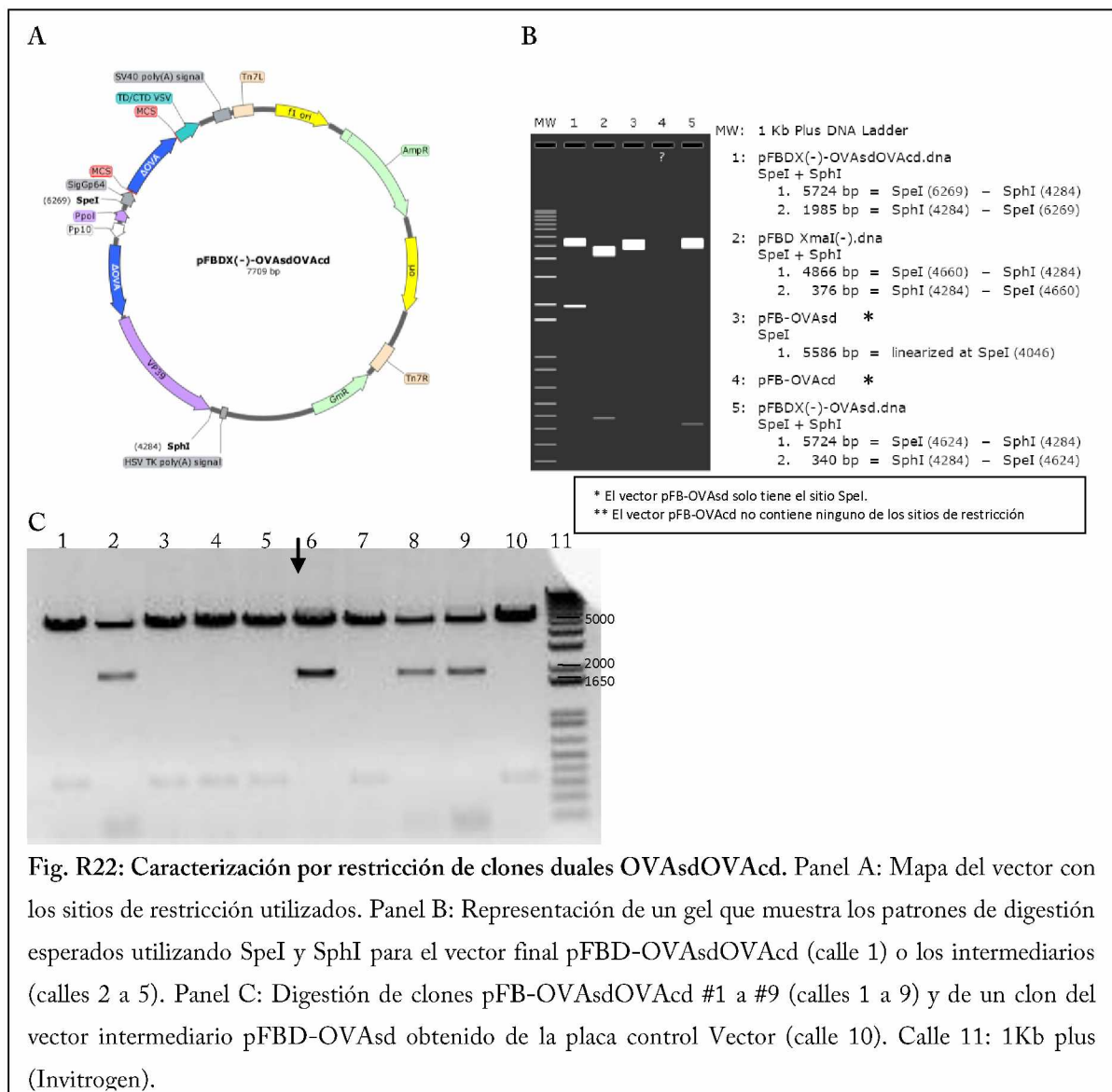


Fig. R22: Caracterización por restricción de clones duales OVAsdOVAcD. Panel A: Mapa del vector con los sitios de restricción utilizados. Panel B: Representación de un gel que muestra los patrones de digestión esperados utilizando SpeI y SphI para el vector final pFBD-OVAsdOVAcD (calle 1) o los intermediarios (calles 2 a 5). Panel C: Digestión de clones pFB-OVAsdOVAcD #1 a #9 (calles 1 a 9) y de un clon del vector intermediario pFBD-OVAsd obtenido de la placa control Vector (calle 10). Calle 11: 1Kb plus (Invitrogen).

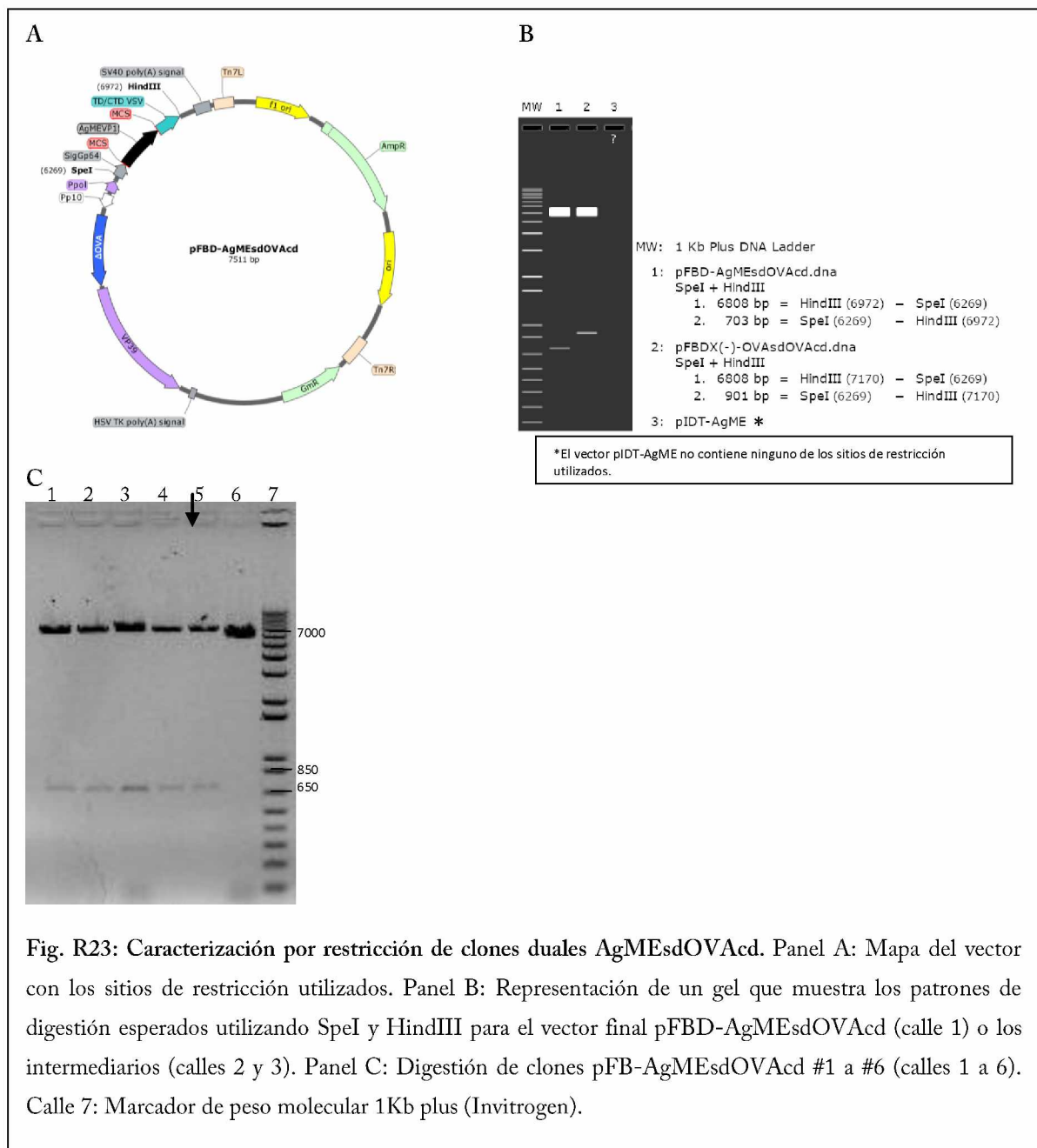
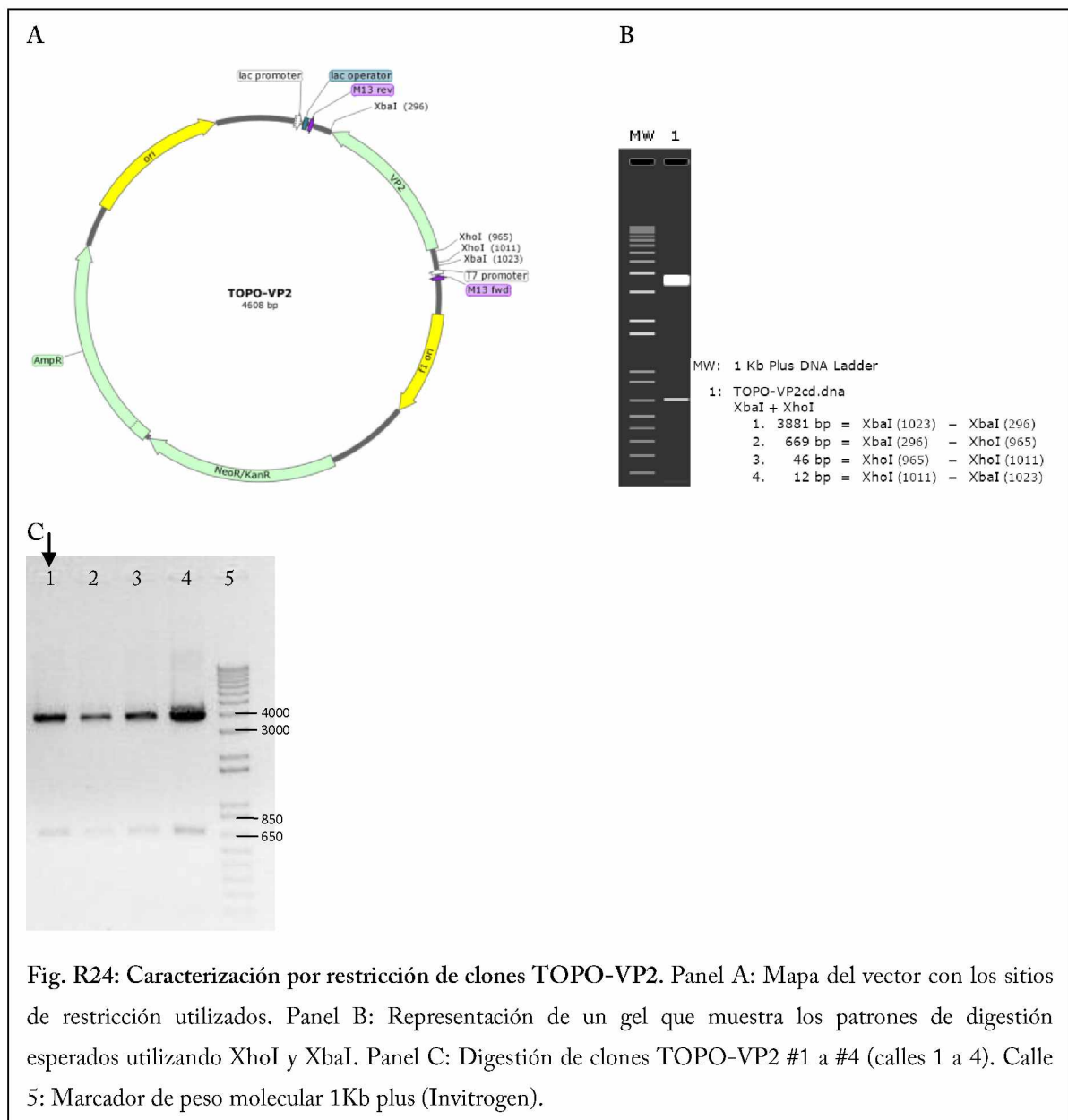
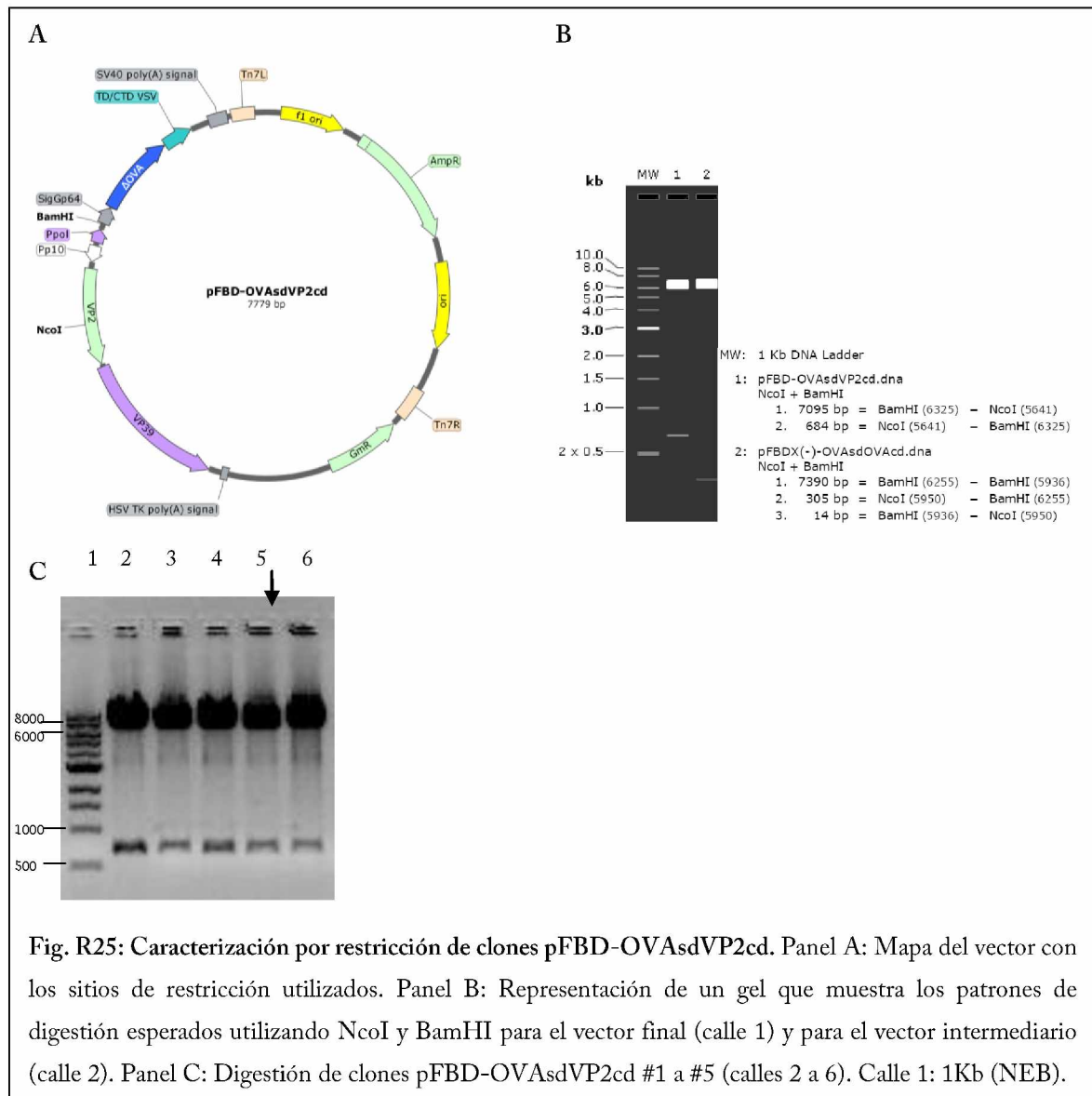
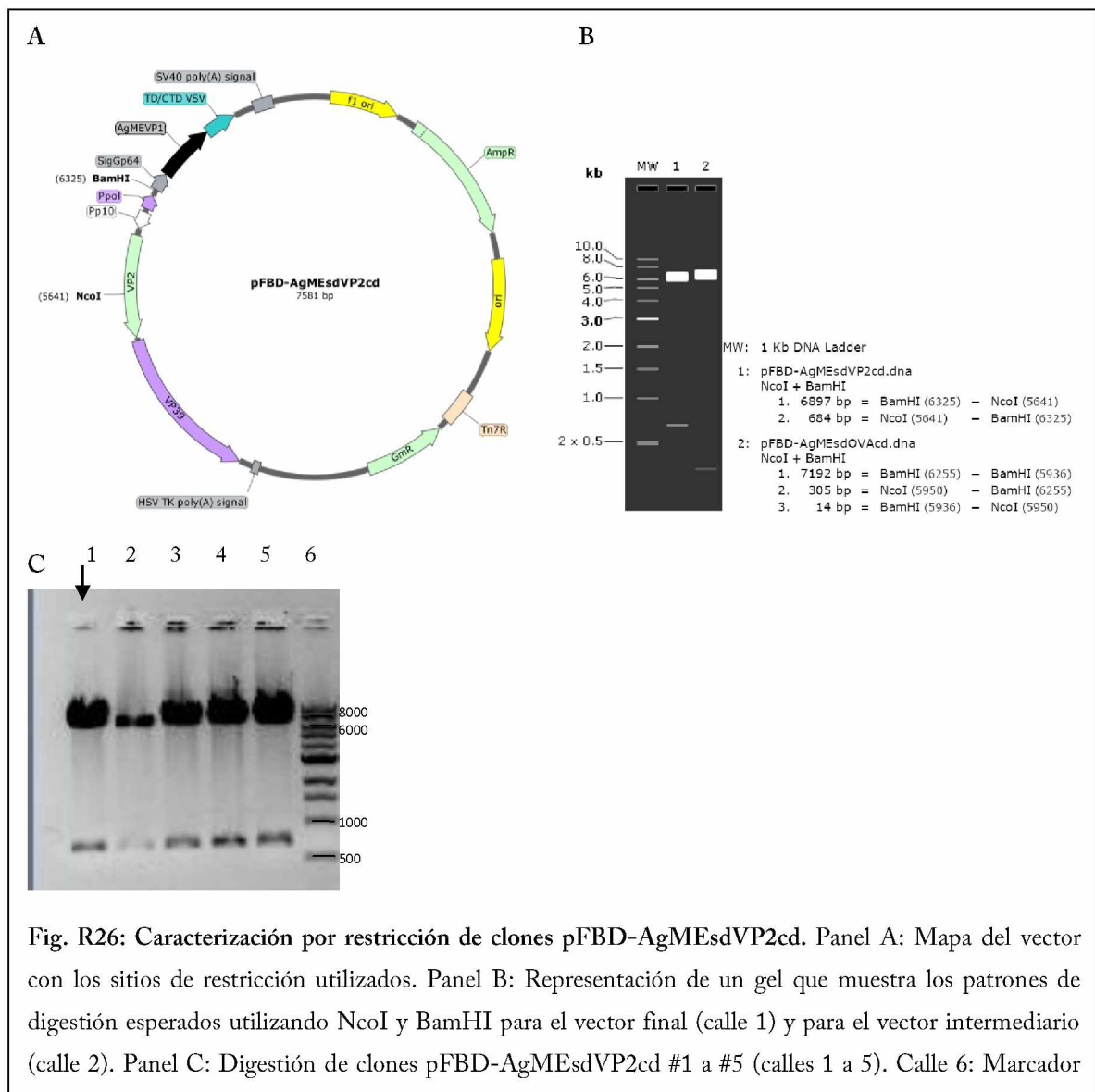


Fig. R23: Caracterización por restricción de clones duales AgMEsdOVAcd. Panel A: Mapa del vector con los sitios de restricción utilizados. Panel B: Representación de un gel que muestra los patrones de digestión esperados utilizando SpeI y HindIII para el vector final pFBD-AgMEsdOVAcd (calle 1) o los intermediarios (calles 2 y 3). Panel C: Digestión de clones pFB-AgMEsdOVAcd #1 a #6 (calles 1 a 6). Calle 7: Marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen).



La secuencia de VP2 en el vector TOPO-VP2 #1 fue corroborada por secuenciación y se utilizó este clon para realizar las siguientes construcciones.





De los resultados obtenidos, se seleccionaron los clones pFBD-OVAsdOVAcd #6, pFBD-AgMEsdOVAcd #5, pFBD-OVAsdVP2cd #5 y pFBD-AgMEsdVP2cd #1 como vectores de transferencia.

Generación de los bácmidos recombinantes

Para obtener los bácmidos recombinantes, para los antígenos de FMDV se procedió de manera similar a la descrita en el capítulo 1: Brevemente, se transformaron bacterias *E. coli* DH10Bac con aproximadamente 100 ng de preparaciones de alta calidad de cada clon seleccionado. La selección se realizó en placas LB-kanamicina-tetraciclina-gentamicina. Varias colonias de cada construcción fueron picadas y re-estriadas y se realizaron cultivos líquidos de colonias de estrías que resultaron completamente blancas. Los bácmidos se

extrajeron con el protocolo de minipreparaciones de DNA modificado. Se confirmó la presencia del *cassette* transpuesto en el bácmido recombinante mediante PCR con los oligonucleótidos específicos universales M13 *for* y *rev* y oligonucleótidos internos que hibridan en secuencias específicas del *cassette*. La figura R27 representa el evento de transposición y los *primers* utilizados para la caracterización por PCR. La figura R28 muestra las construcciones y la caracterización por PCR de clones de bácmidos AgMEsdVP2cd, AgMEsd (AgMEsdOVAcd), VP2cd (OVAcdVP2cd) y el bácmido control OVA (OVAcdOVAcd).

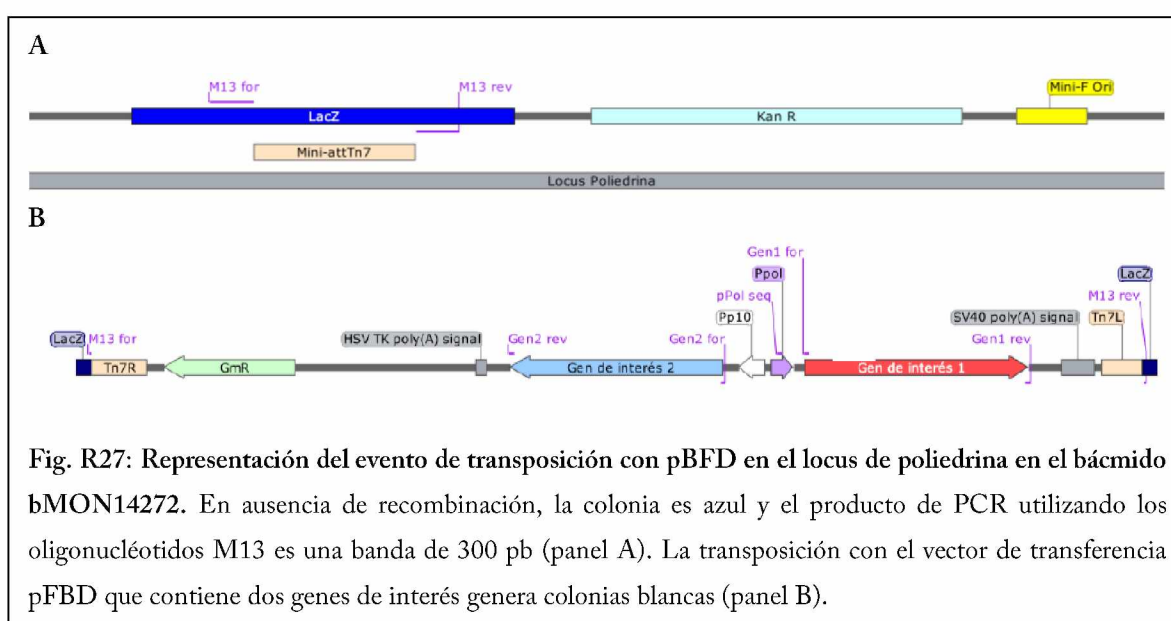


Fig. R27: Representación del evento de transposición con pBFD en el locus de poliedrina en el bácmido bMON14272. En ausencia de recombinación, la colonia es azul y el producto de PCR utilizando los oligonucleótidos M13 es una banda de 300 pb (panel A). La transposición con el vector de transferencia pFBD que contiene dos genes de interés genera colonias blancas (panel B).

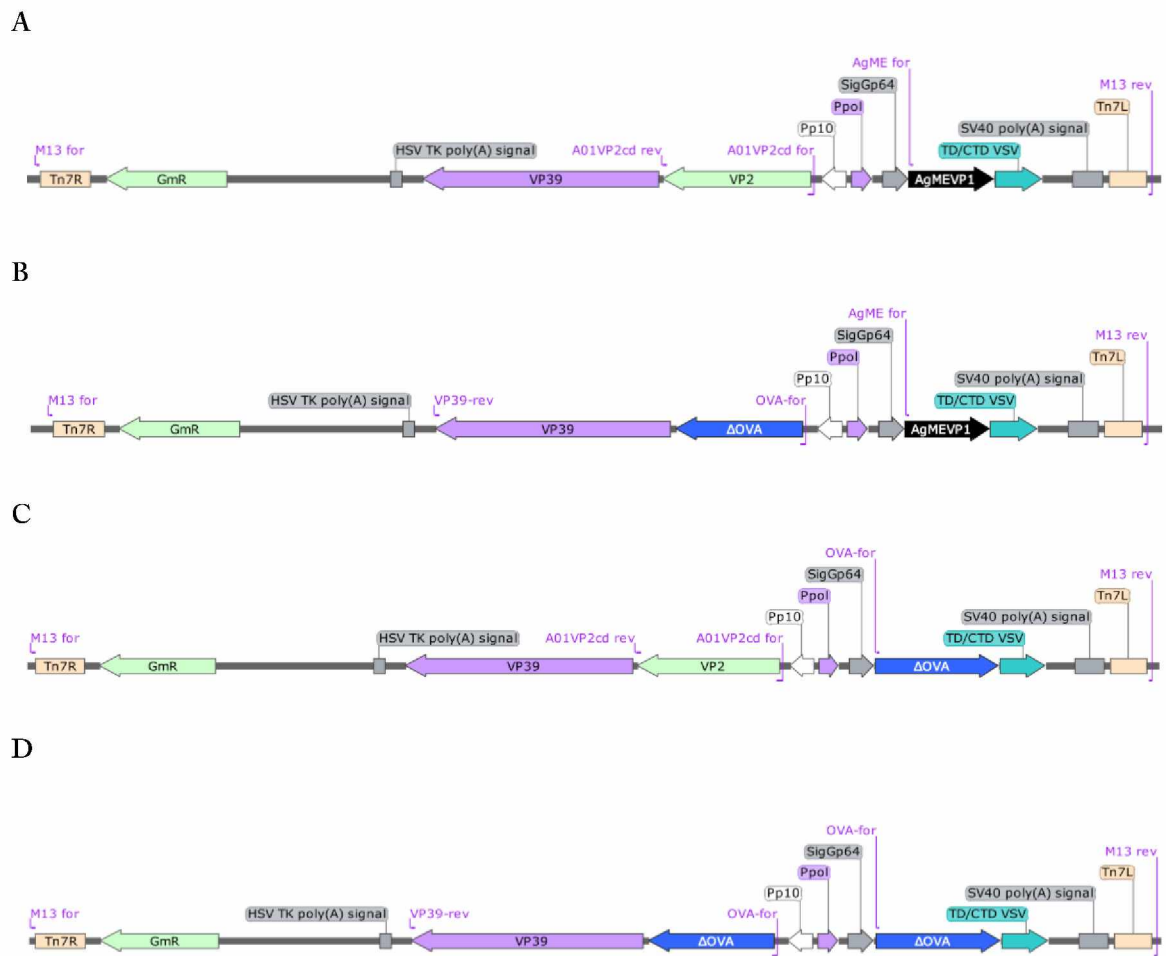


Fig. R28: Caracterización por PCR de bácmidos que contienen los antígenos de aftosa. Panel A a D: Mapa de las construcciones AgMEsdVP2cd (panel A), AgMEsd (panel B), VP2cd (panel C) y OVA (panel D) donde se encuentran representados los oligonucleótidos utilizados.

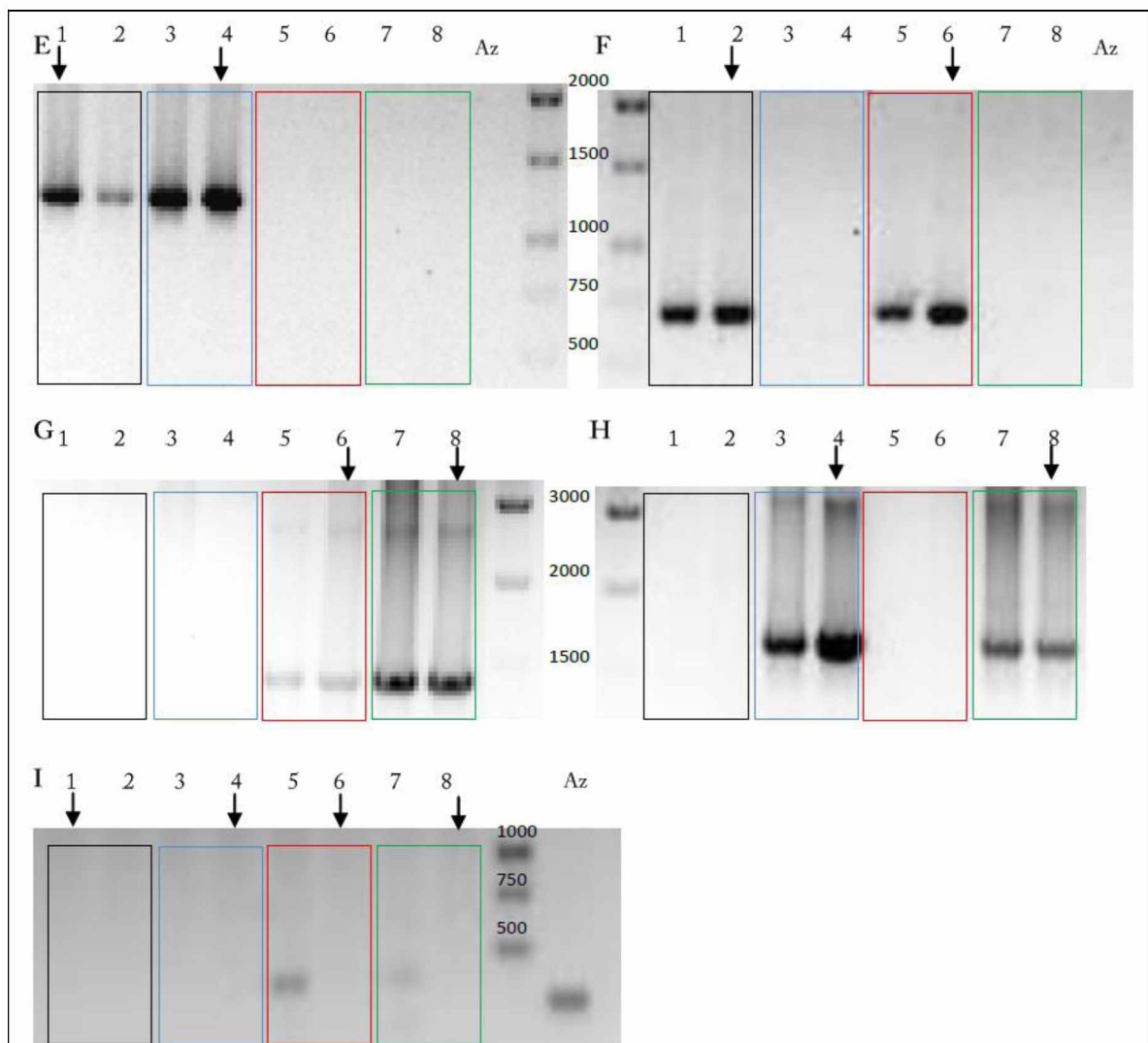


Fig. R28: Caracterización por PCR de bácmidos que contienen los antígenos de aftosa (continuación). Se analizaron por PCR dos clones de bácmidos de cada construcción. El orden de las muestras en todos los casos es Bacm-AgMEsdVP2cd (#1 y #2, recuadro negro, calles 1 y 2), Bacm-AgMEsd (#1 y #2, recuadro azul, calles 3 y 4), Bacm-VP2cd (#1 y #2, recuadro rojo, calles 5 y 6), Bacm-OVA (#1 y #2, recuadro verde, calles 7 y 8) y el bácmido proveniente de una colonia azul (Az). Se utilizó el marcador de peso molecular 1 Kb plus PBL. Panel E: La mix contiene los oligonucleótidos AgME *for* y M13 *rev*. Solo los bácmidos traspuestos que contengan el *cassette* AgMEsd darán un producto de ≈ 1100 pb. Panel F: La mix contiene los oligonucleótidos A01VP2cd *for* y *rev*. Solo el *cassette* VP2cd dará un producto de ≈ 650 pb. Panel G: La mix contiene los oligonucleótidos OVA *for* y M13 *rev*. Solo los bácmidos traspuestos que contengan el *cassette* OVAcd darán un producto de ≈ 1100 pb. Panel H: La mix contiene los oligonucleótidos OVA *for* y VP39 *rev*. Solo el *cassette* OVAcd dará un producto de ≈ 1600 pb. Panel I: La mix contiene los oligonucleótidos M13 *for* y *rev*. El producto de PCR para bácmidos no recombinantes es de ≈ 300 pb.

La PCR con los oligonucleótidos AgME *for* y M13 *rev* (Fig.R18, panel E, recuadros negro y azul) permitió confirmar el evento de recombinación y la presencia del *cassette* AgMEsd en los clones #1 y #2 de las construcciones Bacm-AgMEsdVP2cd y Bacm-AgMEsd. Esta PCR dio negativa para los bácmidos que contienen OVA en SD, pero se obtuvo un producto de amplificación cuando se utilizó el oligonucleótido que hibrida al inicio de la secuencia de esta proteína (panel G, recuadros rojo y verde). Por otro lado, la presencia de una banda de entre 500 y 750 pb en los clones Bacm-AgMEsdVP2cd y Bacm-VP2cd (PCR con oligonucleótidos A01VP2 *for* y *rev*, panel F, recuadros negro y rojo) confirman la presencia de la secuencia de VP2 en esas construcciones. Los bácmidos que contienen OVA fusionada a VP39 dieron negativas a estas PCRs, pero se obtuvieron productos de amplificación al utilizar el oligonucleótido OVA *for* y un oligonucleótido que hibrida en el final de VP39 (panel H, recuadros azul y verde). Finalmente, utilizando M13 *for* y *rev* pudimos evaluar si las preparaciones contenían bácmido sin recombinar (panel I). Con una flecha se encuentran indicados los clones seleccionados para la transfección de células Sf9.

Obtención y caracterización de los BV-FMDV

Los baculovirus recombinantes para los antígenos de FMDV se obtuvieron de manera semejante a la descrita para los recombinantes de OVA. Brevemente, se utilizó 1µg de DNA de cada bácmido seleccionado para transfectar células Sf9 sembradas en placas de seis pocillos a una densidad de 8×10^5 células/pocillo. 4 a 6 días postransfección los sobrenadantes fueron cosechados, clarificados por centrifugación y titulados por dilución a punto final utilizando una línea Sf9-GFP, que posee GFP bajo promotor de poliedrina. Los títulos obtenidos fueron variables entre 1×10^6 y 1×10^8 ufp/ml. Para aumentar el título y el volumen de los *stocks* virales se realizaron dos o tres pasajes por células Sf9 crecidas en monocapa. La caracterización de los BV-FMDV recombinantes se realizó por inmunomicroscopía de fluorescencia de células Sf9 infectadas y *Western blot* utilizando pasajes virales con títulos iguales o superiores a 1×10^8 ufp/ml.

Caracterización por inmunomicroscopía de fluorescencia

Para evaluar la expresión y localización celular del antígeno modelo en las diferentes construcciones, se realizaron ensayos de inmunomicroscopía de fluorescencia de células Sf9 infectadas con BV-AgMEsd, BV-VP2cd o BV-OVA como control. En todos los casos, las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos. Se utilizaron 3×10^5 células por pocillo y una moi aproximada de 10. En todos los casos, 48 hs pos tratamiento con virus, las células fueron lavadas, fijadas y marcadas. Se utilizó el protocolo descripto para la caracterización de los BV construidos en el capítulo I de esta tesis, pero en este caso se utilizó como anticuerpo primario el suero policlonal de conejo anti A-2001 en una dilución 1:1000. El paso de permeabilización no se realizó en las células infectadas con el BV-AgMEsd.

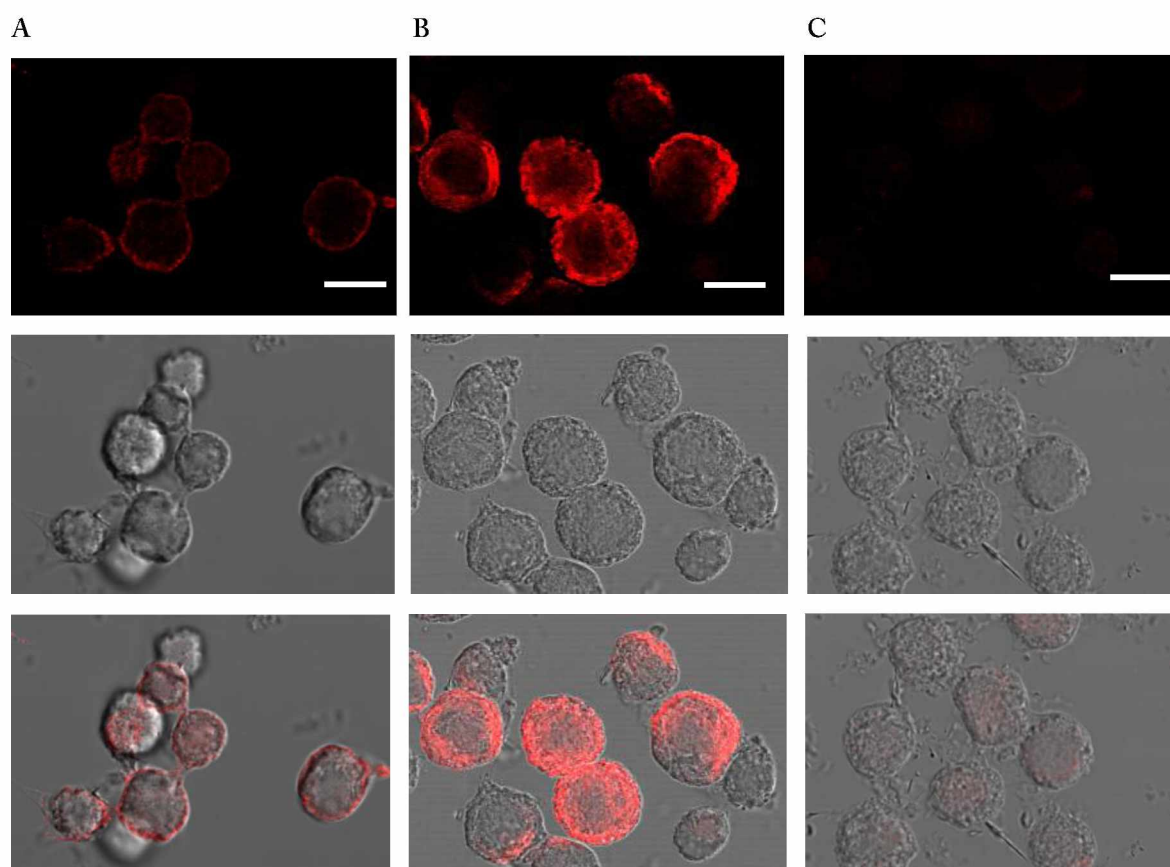
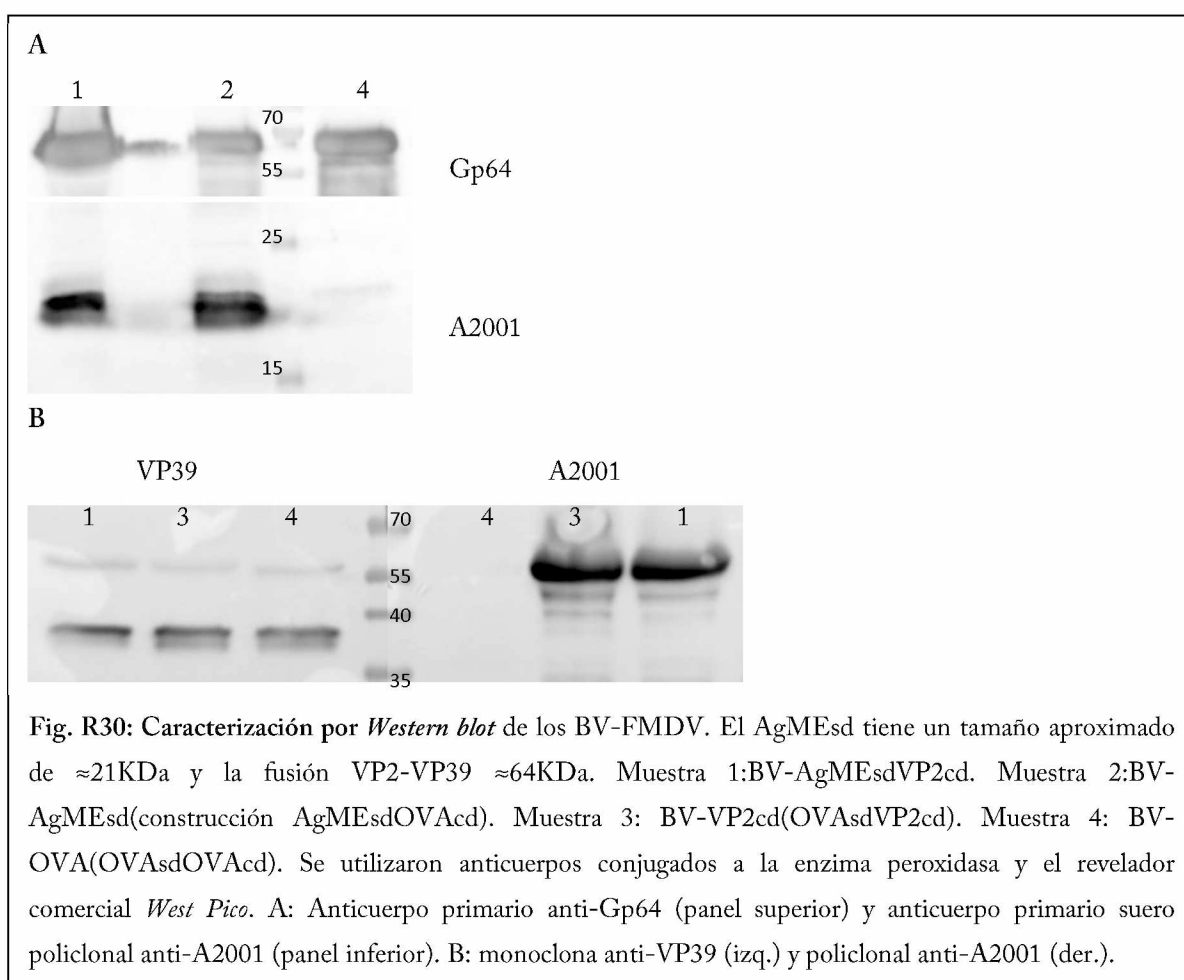


Fig. R29: Caracterización microscopía de fluorescencia de células Sf9 infectadas con los BV recombinantes. Panel A: BV-AgMEsd. Panel B: BV-VP2cd. Panel C: BV-OVA. Se utilizó como anticuerpo primario un suero policlonal anti-A2001 y un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado al fluoróforo Alexa 546. La barra representa 10 μ m.

Las micrografías obtenidas permitieron confirmar la correcta expresión y localización celular de los antígenos. La expresión dentro del *cassette* SD dirige el AgME hacia la membrana plasmática de células Sf9 infectadas (Fig. R29 Panel A), mientras que la proteína VP2 se observa en el citoplasma (Fig. R29 Panel B) a tiempos tempranos post-infección.

Caracterización por *Western blot*

Para confirmar la presencia de los antígenos heterólogos en los viriones, se concentraron por centrifugación muestras de 2 ml de las diferentes construcciones. Los *pellets* se resuspendieron en *cracking buffer* 1X, se resolvieron por SDS-PAGE y finalmente se analizaron por *Western blot*.



El *Western blot* de muestras de virus de las diferentes construcciones confirmó la presencia de los antígenos de A2001 en las partículas virales. Asimismo, se confirmó la localización del AgME en la superficie y de VP2 en la cápside viral (Fig. R31).

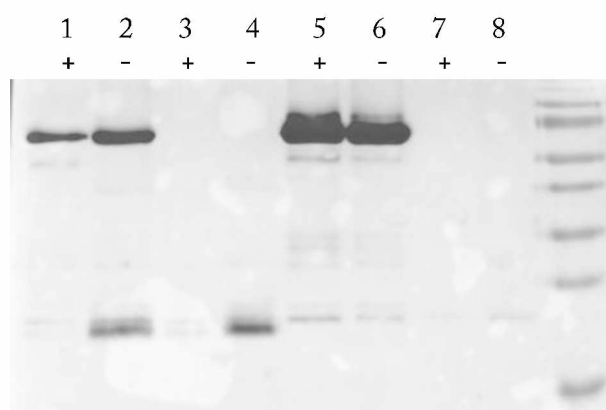


Fig. 31: Caracterización de la localización de los antígenos de aftosa en los viriones por *western blot*. Calles 1 y 2: BV-AgMEsdVP2cd. Calles 3 y 4: BV-AgMEsd. Calles 5 y 6: BV-VP2cd. Calles 7 y 8: BV-OVAAsdOVAcd. El signo (+) indica tratamiento con Tritón, mientras que el signo (-) indica tratamiento con el mismo *buffer* pero en ausencia del detergente. Panel superior: Anticuerpo primario suero policlonal anti-A2001. Panel inferior: Anticuerpo primario anti-Gp64. Anticuerpos secundarios conjugados a la enzima peroxidasa, revelador comercial west Pico.

Evaluación de la respuesta protectora generada por los BV-FMDV

La generación de respuesta protectora adaptativa contra cualquier virus depende fundamentalmente de neutralizar el virus circulante y lograr eliminar las células infectadas para evitar la producción y liberación de nuevos viriones. Para el caso particular del virus de la fiebre aftosa, fue ampliamente demostrada la necesidad de generar anticuerpos contra epitopes específicos que permiten la neutralización de la infección. Asimismo, se discutieron los aportes que realizaron diferentes grupos en cuanto a la importancia relativa de la respuesta celular en infecciones agudas y crónicas. Teniendo en cuenta que los BV son potentes inmunomoduladores e inductores de respuesta celular citotóxica, propusimos construir y evaluar BV recombinantes con antígenos del aislamiento de campo A/Arg/2001. Se utilizaron los esquemas experimentales y modelos ya ensayados en los capítulos I y II de esta tesis, con las modificaciones apropiadas debido a la falta de las herramientas óptimas, con las que sí se contaba para el antígeno modelo OVA. Así, la evaluación de la respuesta citotóxica se realizó respetando los tiempos, dosis y vías ensayados, pero enmarcada en un experimento de desafío utilizando el modelo descripto por Salguero [160]. Por otro lado, las

modificaciones realizadas para la evaluación de la respuesta humoral se realizaron solo en el análisis de los sueros.

Evaluación de la respuesta humoral

Para evaluar el potencial inmunogénico y la calidad antigénica del vector que transporta antígenos de FMDV en su superficie, se inmunizaron grupos de 4 ratones hembras Balb/c de 6 semanas de edad por la vía i.p. con 1×10^8 ufp/ratón. Se realizaron 3 inmunizaciones sucesivas cada 15 a 21 días utilizando el BV que transporta el AgME (BV-AgMEsdOVAcd) o el BV-OVA (BV-OVAcdOVAcd) como control negativo. Como control positivo se inmunizó un grupo de animales con una única dosis de la vacuna comercial. Se analizaron diluciones 1/25 de los sueros obtenidos luego de la última dosis mediante ELISA de captura (Fig. R32, Panel A) y *Western blot* (Fig. R32, Panel B)

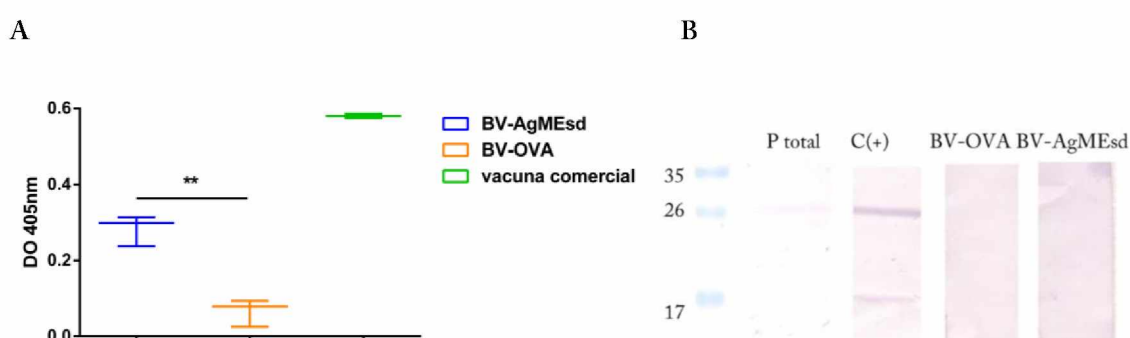


Fig. R32: Análisis de los anticuerpos específicos mediante ELISA y *Western blot*. Se inmunizaron ratones Balb/c con 3 dosis de 1×10^8 ufp/ratón vía i.p. y se analizaron los sueros del último sangrado. Panel A: ELISA de captura de diluciones 1/25 de los sueros de los animales vacunados con los diferentes BV o una dilución 1/200 del *pool* de animales vacunados con la vacuna comercial. Panel B: *Western blot*. Como anticuerpo primario se utilizaron *pools* de los sueros de los animales vacunados con los diferentes BV en dilución final 1/25 o una dilución 1/200 del *pool* de animales vacunados con la vacuna comercial. Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados a la enzima fosfatasa alcalina y el revelador comercial NBT-BCIP.

Como se esperaba, los animales inmunizados con la vacuna comercial mostraron anticuerpos específicos anti FMDV, tanto por ELISA como por *Western blot*, donde reconocieron las bandas específicas esperadas. Asimismo, los animales control negativo mostraron bajas densidades ópticas por ELISA y no revelaron bandas específicas. Por otro lado, el ELISA de captura de los sueros de los animales vacunados con el BV que transporta en su superficie el antígeno multiepitópico permitió detectar anticuerpos específicos contra

FMDV. Sin embargo, al analizar estos mismos sueros por *Western blot*, no fue posible detectar señal específica contra las proteínas resueltas en geles desnaturalizantes. Estos resultados en conjunto sugieren que los anticuerpos generados por el vector recombinante son capaces de reconocer epítopos conformacionales del FMDV, que desaparecen al desnaturalizar las proteínas en los ensayos de *Western blot*.

Evaluación del aporte de la presencia de VP2 en la cápside a la protección

Se inmunizaron grupos de 6 ratones hembras C57BL/6J de 8 semanas de edad al inicio del experimento vía i.p. con 1×10^8 ufp/ratón de BV-VP2 o BV-OVA como control negativo. Asimismo, se incluyó un grupo que fue inmunizado con la dosis apropiada de la vacuna comercial (Bioaftogen – Biogénesis Bagó). 7 días post inmunización los ratones fueron desafiados por inoculación vía i.p. de $1,5 \times 10^4$ ufp de FMDV-A2001 en un volumen final de 200 μ l. El procedimiento se realizó dentro del laboratorio de bioseguridad NBS-3A OIE del Instituto de Virología de INTA, Castelar, donde los animales fueron mantenidos y monitoreados diariamente. La fig. R33 muestra el esquema de inmunización y desafío.



Fig. R33: Esquema de inmunización y desafío. Ratones C57Bl/6J se inmunizaron por vía i.p. con 1×10^8 ufp de BVs (BV-VP2cd o BV-OVA como control) o con una dosis de la vacuna comercial. Siete días post inmunización, los animales fueron desafiados $1,5 \times 10^4$ ufp de A/Arg/2001.

Se evaluó el estado general del animal teniendo en cuenta signos clínicos (respiración, temblores, espasmos), apariencia física (piloerección, posturas indicativas de dolor, decaimiento) y respuesta a estímulos externos (movimiento al tacto). Se consideró como criterio de punto final la ausencia de respuesta a estímulos externos. Se contabilizaron diariamente los ratones que murieron o debieron ser sacrificados. La fig. R34 muestra los resultados obtenidos. Para realizar el gráfico y el análisis estadístico se empleó el programa GraphPad® versión 6.0 para Windows (La Jolla, CA).

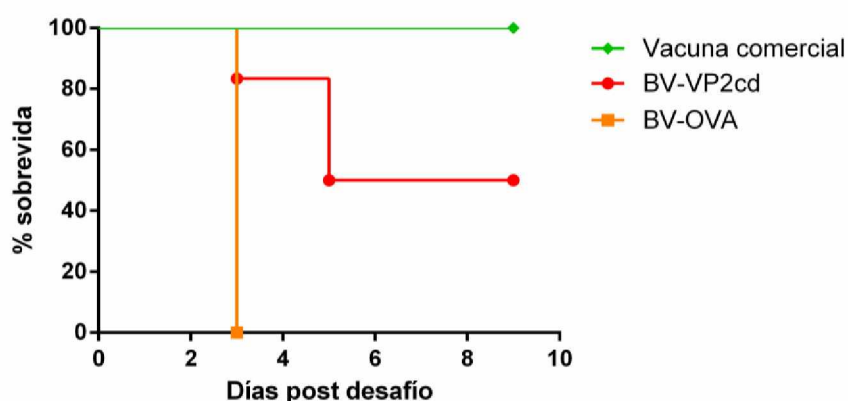


Fig. R34: Porcentaje de supervivencia. Los ratones inmunizados con BV-VP2, BV-OVA o una dosis de la vacuna comercial y desafiados fueron monitoreados diariamente. Se contabilizaron diariamente los ratones muertos y aquellos que debieron ser sacrificados.

Como se esperaba, el 100% de los ratones inmunizados con la vacuna comercial resultaron protegidos. Por otro lado, todos los ratones inmunizados con el BV control (BV-OVA) y un animal del grupo BV-VP2cd presentaron síntomas a las 48 hs (movimiento lento) y hacia el 3 día debieron ser sacrificados por razones éticas. El resto de los animales del grupo BV-VP2 presentaron también síntomas leves (espasmos con baja frecuencia pero mantenían movilidad), dos de los cuales murieron al día 5. Los tres ratones restantes se recuperaron y sobrevivieron hasta el final del experimento, encontrándose en perfectas condiciones. El análisis de estos resultados permite concluir que, a las dosis ensayadas, el BV que presenta la proteína VP2 en la cápside genera un nivel de protección del 50% hasta 9 días post-desafío. El test estadístico Log-rank (Mantel-Cox) permitió comprobar que la diferencia entre las curvas de supervivencia es estadísticamente significativa.

Evaluación del candidato vacunal

Luego de analizar en forma independiente las respuestas generadas por los antígenos seleccionados, se determinó la inmunogenicidad del baculovirus dual que posee el AgME en la superficie y a su vez transporta la proteína VP2 en la cápside. Dicho BV, denominado BV-FMDV, fue evaluado mediante un experimento de desafío en el modelo ratón ya descrito. Si bien ha sido posible evaluar el aporte de la presencia de VP2 de forma exitosa, dicho modelo tiene una ventana de susceptibilidad al desafío que no es compatible con los esquemas de inmunización de 3 dosis, una cada 2 a 3 semanas, que hemos empleado para

generar anticuerpos. A fin de compensar la ausencia de una dosis y la reducción en el tiempo entre las dos restantes, en este experimento se utilizaron *stocks* concentrados por ultracentrifugación, permitiendo así inmunizar con 10 veces más partículas virales. Dos grupos de 6 ratones hembras C57BL/6J de 5 semanas de edad al inicio del experimento recibieron vía i.p. 1×10^9 ufp/ratón de BV-FMDV o BV-OVA como control negativo. Un tercer grupo fue inmunizado con la vacuna comercial (Bioaftogen – Biogénesis Bagó). Dos semanas después, estos animales recibieron una segunda dosis equivalente a la primera.

Por otro lado, un cuarto grupo de animales fue inmunizado con PBS. Todos los ratones fueron desafiados a la semana 8 por inoculación vía i.p. de $1,5 \times 10^4$ ufp de A/Arg/2001 en un volumen final de 200 μ l. El procedimiento se realizó dentro del laboratorio de bioseguridad NBS-3A OIE del Instituto de Virología de INTA, Castelar, donde los animales fueron mantenidos y monitoreados diariamente. Se evaluó el estado general de los animales teniendo en cuenta signos clínicos (respiración, temblores, espasmos), apariencia física (piloerección, posturas indicativas de dolor, decaimiento) y respuesta a estímulos externos (movimiento al tacto). Se consideró como criterio de punto final la ausencia de respuesta a estímulos externos. Se contabilizaron diariamente los ratones que murieron o debieron ser sacrificados. Para realizar el gráfico y el análisis estadístico se empleó el programa GraphPad® versión 6.0 para Windows (La Jolla, CA). La figura R35 muestra los resultados obtenidos.

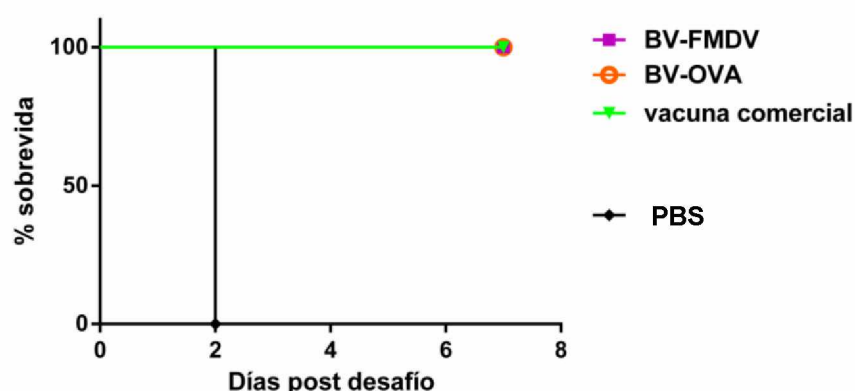


Fig. R35: Porcentaje de supervivencia. Los ratones inmunizados con dos dosis de BV-FMDV, BV-OVA o PBS, o con una única dosis de la vacuna comercial fueron desafiados y monitoreados. Se contabilizaron diariamente los ratones muertos o aquellos que debieron ser sacrificados.

Como se esperaba, el 100% de los ratones inmunizados con la vacuna comercial resultaron protegidos, mientras que todos los ratones inmunizados con PBS murieron o debieron ser sacrificados a las 48 hs. Los animales que recibieron 2 dosis elevadas de BV, transportaran o no los antígenos específicos, sobrevivieron al desafío. Si bien este resultado fue inesperado, resulta interesante analizarlo. En este caso, la protección parece estar relacionada con la carga y/o el número de dosis utilizadas. Como se comentó previamente, los BV son potentes inductores de la respuesta innata, lo que le ha permitido a varios grupos de investigación, incluido el nuestro, conseguir la protección de animales frente a desafíos letales hasta algunos pocos días pos vacunación. Con el objetivo de evaluar la respuesta por fuera de esa ventana de protección, en todos los experimentos de desafío realizados en esta tesis, la última dosis se realizó 7 días antes de la inoculación de FMDV. En experimentos previos, este período de tiempo había resultado suficiente para permitir que los mecanismos de respuesta innata ya no estén involucrados. Sin embargo, el aumento de la carga de BV empleada y/o la aplicación de una segunda dosis parecen haber ampliado el período de protección, enmascarando los efectos de la respuesta específica contra los antígenos transportados. Recientemente, se han publicado algunos trabajos en los que se reporta la existencia de mecanismos a través de los cuales es posible generar respuestas innatas aumentadas al aplicar más de una dosis de inmunógeno. Este efecto *booster*, hasta ahora ampliamente estudiado dentro del campo de la respuesta adaptativa y recientemente encontrado en respuestas innatas, podría explicar los resultados obtenidos en este experimento.

DISCUSIÓN GENERAL

CONCLUSIONES

DISCUSIÓN GENERAL

Es ampliamente aceptado en la actualidad que la vacunación constituye el método más apropiado para controlar y erradicar enfermedades infecciosas. De hecho, muchas de las plagas que afectaron a la humanidad tales como la viruela, el sarampión o la poliomielitis han sido controladas mediante campañas de vacunación.

La mayoría de las vacunas humanas o las destinadas a animales de interés pecuario se basaron en microorganismos inactivados o atenuados y fueron desarrolladas de manera empírica, sustentadas en las tecnologías de inactivación por calor, compuestos químicos e irradiación o mediante la atenuación de cepas por pasajes en cultivo para reducir su virulencia. Sin embargo, la necesidad de contar con vacunas más seguras, más efectivas, definidas en su composición, capaces de diferenciar entre animales vacunados e infectados o que omitan manipular el agente infeccioso durante su proceso de producción obligó a pensar en nuevas estrategias de concepción de vacunas. En este sentido, existe un particular interés en las vacunas a subunidad, en las que se incluye un número restringido de componentes individuales (antígenos) específicos del patógeno, capaces de conferir una inmunidad protectora. Obviamente, las probabilidades de encontrar los componentes efectivos de una vacuna a subunidad de manera empírica son muy bajas.

En paralelo, los sucesivos cambios en las normativas regulatorias derivaron en requerimientos de aprobación cada vez más estrictos, y los altísimos costos y extensos períodos que requiere el desarrollo y la puesta a punto de la producción de un nuevo producto farmacéutico generaron la indudable necesidad de implementar estrategias que, con algún grado de certeza, aseguraran el éxito del desarrollo. Es así que el concepto que aquí se describe como desarrollo racional no es ni más ni menos que el concepto conocido en el ámbito de la industria como calidad por diseño (QbD, *Quality by Design*), delineado por primera vez por el experto en calidad Joseph M. Juran. Diseñar para la calidad y la innovación es uno de los tres procesos universales que forman parte de la trilogía descrita por Juran, donde se analiza lo que se requiere para lograr avances en nuevos productos,

servicios y procesos [163]. Juran cree que la calidad se puede planificar y que la mayoría de las crisis y problemas de calidad se relacionan con la forma en que se planificó, o no se planificó, la misma. Si bien los principios de Calidad por diseño se han utilizado para mejorar los productos y procesos en la industria, particularmente la automotriz, también han sido adoptados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de Norteamérica (FDA) para el descubrimiento, desarrollo y fabricación de fármacos. Una revisión interesante de los desarrollos llevados a cabo mediante esta aproximación fue realizada por Rathore [164]. Luego, la necesidad de homogeneizar criterios con el objetivo de simplificar la comercialización de fármacos humanos producidos en diferentes regiones, la FDA en conjunto con la Agencias Europea de Medicamentos y de Japón construyeron las guías ICH, que proporcionan lineamientos unificados para que los fabricantes implementen Calidad por diseño en sus propias operaciones (<http://www.ich.org/products/guidelines.html>). El Comité Directivo de ICH se reúne dos veces al año para discutir el progreso de sus esfuerzos. Este aporte práctico debería ayudar a garantizar que la gestión del riesgo y la gestión del conocimiento de calidad se utilicen para realizar adaptaciones del ciclo de vida del producto que mantengan el control del proceso y la calidad del mismo.

Retomando el repaso sobre los avances más importantes en el campo de la inmunología, a finales del siglo XX se identificaron las células T como las responsables últimas de controlar la respuesta inmune y la investigación en el diseño de las vacunas se enfocó entonces en activar dichas células. En el siglo XXI comienza a reconocerse la importancia de la respuesta innata y de las células dendríticas en el desarrollo de una respuesta inmune óptima. Las respuestas inmunes innata y adaptativa progresan a través de una serie de pasos que son orquestados por las células dendríticas, dirigidos por las células T y citoquinas específicas y finalmente llevados a cabo por células activadas y anticuerpos. Las células dendríticas son esenciales para iniciar una respuesta inmune, presentar un antígeno a una célula T y determinar el perfil de respuesta conducido por las células T [165]. Las células dendríticas inmaduras se encuentran continuamente examinando el entorno y capturando antígenos del medio externo. Cuando interactúan con patógenos o sus estructuras, las células dendríticas se activan produciendo citoquinas y adquiriendo un fenotipo de célula

presentadora de antígeno. Estas células responden de manera diferente según cuáles sean los receptores que reciban las señales externas, produciendo así distintas citoquinas. Es entonces en parte el perfil de estas citoquinas lo que determina el tipo de respuesta inmune adaptativa [166], [167].

Hoy en día son evaluadas variadas estrategias y diseños de vacunas de nueva generación. En particular, a partir de péptidos sintéticos se pueden recrear aquellas porciones de una proteína involucradas directamente en una respuesta neutralizante y, adecuadamente formulados, estos péptidos pueden resultar antigénicos, aunque su pequeño tamaño limita su capacidad para iniciar una fuerte y duradera respuesta inmune, así como su estabilidad. Para aumentar su capacidad antigénica, los péptidos han sido acoplados a diferentes proteínas sencillas como OVA o KLH, aunque en la actualidad se prefiere su acoplamiento a proteínas transportadoras o a estructuras multiméricas con mayor capacidad inmunogénica, como los virus o las VLPs. Esta propiedad de aumentar la inmunogenicidad de los péptidos sintetizados químicamente y acoplados a estas estructuras *carrier* o formando parte de una unidad transcripcional quimérica tiene varios aspectos. Por un lado, estas estructuras son de mayor tamaño y se asemejan más a los patógenos endocitados por fagocitos profesionales. Además, por cada partícula fagocitada, la célula fagocítica presentadora de antígeno incorpora múltiples copias de la secuencia de interés. Finalmente, la proteína *carrier* puede aportar una importante cantidad de epitopes T reconocidos por los linfocitos T colaboradores, con potencial capacidad para interactuar con los linfocitos B o T citotóxicos específicos para los epitopes derivados del patógeno contra el que se espera montar una respuesta inmune efectora.

En general, las VLP fueron descritas como son estructuras muy inmunogénicas para células B, capaces de inducir fuertes y duraderas respuestas humorales mediadas por IgG, aún en ausencia de adyuvantes. Además, son capaces de alcanzar la vía del CMH-I y -II *in vivo*, probablemente debido a su naturaleza particulada, la que permite además la incorporación de múltiples epitopes dentro de la célula presentadora [13]–[15]. El tamaño de las VLP parece favorecer su captura por parte de las CD por la vía de macropinocitosis o endocitosis, mecanismos que tienen un rol central en la activación de la respuesta inmune

innata y adaptativa [16], [17], además de facilitar su purificación en las etapas finales de su producción. Así, se desarrolló un sinnúmero de vacunas experimentales explotando estas ventajas de las VLP, ya sea contra patógenos virales cuyas proteínas son capaces de autoensamblarse espontáneamente en sistemas de expresión o contra péptidos heterólogos transportados por estas estructuras. Muchas de ellas fueron adecuadamente ensambladas en el sistema baculovirus-células de insecto, como las derivadas de proteínas de rotavirus, de parvovirus porcino, del virus de la hepatitis B o del papilomavirus humano. Sin embargo, Hervas y colaboradores, en el laboratorio de la Dra. Claude Leclerc, descubrieron que las propiedades inmunoestimuladoras que VLP quiméricas derivadas de parvovirus porcino conferían a un péptido heterólogo procedente de la proteína ovoalbúmina, medido como lisis específica en un ensayo de citotoxicidad *in vivo* (CTL), desaparecían completamente cuando esas VLP eran purificadas mediante cromatografía de tamiz molecular [43]. Los autores concluyeron inequívocamente que los baculovirus contaminantes de las preparaciones de VLP, aún en pequeñas cantidades, fueron esenciales para montar una respuesta inmune citotóxica efectiva contra OVA. Este resultado fue crucial para determinar la capacidad adyuvante e inmunomoduladora del fenotipo brotado del baculovirus *AcMNPV*. Estas propiedades adyuvantes, tanto para respuestas humorales dependientes de linfocitos T como citotóxicas, pueden ser explotadas mediante la incorporación de baculovirus brotados en las formulaciones vacunales. Si bien este grupo fue pionero, trabajos posteriores en los que se utilizaron activos farmacéuticos producidos en el sistema baculovirus-células de insecto presentaron o describieron el efecto que produce la presencia de trazas de virus en las respuestas inmunes generadas por las formulaciones vacunales finales [84].

Entre las consideraciones a tener en cuenta en el diseño racional de una vacuna recombinante, la elección del antígeno contra el que se dispararán las respuestas inmunes efectoras es indudablemente crucial. Sin embargo, salvo muy pocas excepciones, las proteínas por sí solas no poseen capacidad inmunogénica. Los motivos que el sistema inmune de los mamíferos reconoce como señal de peligro son moléculas de presencia mucho más conspicua y se denominan patrones moleculares de reconocimiento de patógeno o PAMP. Ejemplos de estos patrones son el RNA de cadena doble y simple, el LPS,

hidratos de carbono y motivos CpG de DNA no metilado. Flagelina, la proteína que compone los flagelos bacterianos, constituye justamente una de las pocas excepciones como proteína capaz de ser reconocida como PAMP por células del sistema inmune innato. Así, para montar una adecuada respuesta inmune contra antígenos proteicos, es indispensable incluir alguna sustancia con la capacidad de impactar en el sistema inmune innato y así modular adecuadamente las células efectoras de la respuesta adaptativa, fundamentalmente los linfocitos T y B. Como se mencionó, los baculovirus tienen la capacidad de ejercer acciones adyuvantes promoviendo respuestas humorales y celulares contra antígenos coadministrados, provocando la maduración células dendríticas y la producción de citoquinas inflamatorias.

A pesar de que ambos fenotipos virales comparten la gran mayoría de los componentes, incluidos el genoma y la mayoría de las proteínas estructurales, sólo el fenotipo brotado y no el ocluido han sido explotados como vectores vacunales. Nuestro grupo estudió el impacto del fenotipo ocluido (ODV) en la inducción de respuestas inmunes en ratones y demostró que los ODV fueron incapaces de estimular la secreción de IFN- γ , IL-6 e IL-12 y de inducir un estado antiviral contra VSV a tiempos cortos. Además, los ODV fueron incapaces de inducir una inmunidad celular contra antígenos coadministrados 7 días post inoculación. Cuando se analizó la interacción de los ODV con CD diferenciadas de médula ósea, se observó que a pesar de poder ingresar y alcanzar compartimientos acídicos tardíos, no indujeron su maduración. Además, mediante ensayos de colocalización se demostró que ambos fenotipos alcanzan compartimientos diferentes, siendo probablemente las diferencias estructurales entre ODV y BV las responsables de sus diferentes destinos dentro de la célula dendrítica, determinando sus impactos diferenciales en la respuesta inmune [46].

Este efecto de los baculovirus es principalmente ejercido a través de un mecanismo mediado fundamentalmente por interferones α y β , aunque se demostró que están involucrados mecanismos independientes de interferones. Así, su inclusión como adyuvante coadministrado con antígenos de naturaleza particulada podría constituir una estrategia de vacunación adecuada. Sin embargo, investigaciones llevadas adelante por el laboratorio del Dr. Sebastián Amigorena sugieren fuertemente que los distintos fagosomas pueden tener

comportamientos autónomos, sirviendo como base para la discriminación intracelular entre antígenos propios y no propios. Esto es, un fagosoma que incorpora un antígeno junto con el PAMP puede derivar los péptidos de degradación de ese antígeno a vías de presentación antigénica productivas, mientras que si el adyuvante y el antígeno proteico ingresan por distintas vías, el fagosoma que incorporó el antígeno sin PAMP puede derivar en la inducción de anergia [168].

Después de más de 30 años de desarrollo del sistema baculovirus y una enorme experiencia en la producción de proteínas recombinantes simples y complejas empleando esta tecnología, la investigación en vacunología que involucra baculovirus recombinantes ahora se reconoce como una poderosa herramienta. Varias ventajas hacen a los BV vectores vacunales ideales: la simplicidad de manipulación, la posibilidad de ampliar la producción industrial, la disponibilidad de vectores plasmídicos que permitan la localización de diferentes antígenos en diferentes regiones de la partícula viral, la capacidad de los viriones brotados para transducir un amplio espectro de las células de mamíferos y el fuerte impacto de los mismos en el sistema inmune innato de los mamíferos [42], [76]. Además de su clásico empleo biotecnológico como sistema de expresión de proteínas, el baculovirus *AcMNPV* fue recientemente empleado como estructura transportadora de proteínas heterólogas o péptidos, en la superficie de los viriones brotados, estrategia conocida como *baculovirus display*. Esta estrategia permite la presentación repetida de sitios antigénicos en estructuras particuladas, aprovechando las mencionadas propiedades inmunoestimulatorias de los baculovirus. De hecho, la misma macromolécula compleja incluye los antígenos a ser reconocidos y presentados por el sistema inmune y los PAMP que impactarán en los sensores PRR de las células dendríticas, los que ingresarán en el mismo fagosoma o macropinocitoma. Fue demostrado previamente por nuestro grupo que cuando el antígeno modelo OVA y el virión brotado de *AcMNPV* estaban en la misma estructura, la respuesta CTL específica al péptido SIINFEKL de OVA de ratones vacunados fue unas 30.000 veces mayor que cuando se administraron cantidades equivalentes de OVA coadministrada con viriones salvajes de baculovirus [104]. En particular, este BV-OVA expresa la proteína antigénica como fusión a una segunda copia de la proteína de cápside VP39, lo que permite la generación de partículas con nucleocápsides quiméricas, cuyos péptidos clase I son

presentados en la superficie de la CD mediante la vía de presentación cruzada de antígenos, generando así potentes respuestas citotóxicas. Si bien esta estrategia es indudablemente poderosa, numerosos grupos continúan utilizando la transducción como herramienta para presentar antígenos en el contexto del CMH-I y los resultados obtenidos continúan siendo exitosos. Por otro lado, ya se mencionó que la estrategia de *display* clásica en superficie empleando fusiones a GP64 actualmente puede ser reemplazada por una versión optimizada que emplea el dominio transmembrana y citosólico de la proteína G de VSV, lo que permite aumentar la cantidad de antígeno recombinante en la superficie y despolarizar su ubicación en el virión brotado.

Utilizando *AcMNPV* para presentar antígenos en la superficie de viriones o para dirigir su expresión bajo promotores de mamíferos, varios investigadores han desarrollado vacunas experimentales con la capacidad de provocar respuestas humorales contra diferentes patógenos, revisadas por Lin [68]. El reconocimiento de los epitopes heterólogos en la superficie de los BV por los LB produce anticuerpos específicos contra los mismos y, a su vez, genera la expansión de clones de linfocitos B después de la colaboración con LT. Los LB encuentran antígenos solubles o particulados en órganos linfoides secundarios unidos a la superficie de macrófagos, células dendríticas o células dendríticas foliculares en una forma no procesada y esta interacción desencadena la formación de la sinapsis inmunológica [169]. Las partículas endocitadas por los LB se procesan y los péptidos derivados se presentan a los linfocitos T CD4 + en el contexto de las moléculas de CMH-II. Así, los vectores baculovirales que muestran varias copias de antígenos heterólogos sirven tanto como fuente directa de antígenos no procesados para los LB, es decir, como *carrier* permitiendo la presentación en forma particulada, sino que también posee PAMPs que permiten activar a las células especializadas, y en particular permiten madurar células dendríticas. Las CD maduras y que presentan péptidos específicos en CMH clase II son entonces capaces de activar las células CD4 + que reconocen dicho péptidos en la superficie de la CD. En concordancia con esto, en el capítulo I de esta tesis se demostró que el BV que presenta OVA en su superficie (BV-OVA_{sd}) pero no así el que transporta el antígeno en la cápside (BV-OVA_{cd}), fue capaz de generar anticuerpos específicos, incluso luego de la primera inmunización. A las dosis ensayadas, se detectaron bajos títulos de anticuerpos en los

ratones vacunados con el BV que dirige la transducción de OVA (BV-OVA_{cag}) luego del segundo refuerzo. Si bien la generación de anticuerpos utilizando la construcciones similares había sido previamente reportada [170], [171], el mecanismo mediante el cual los antígenos expresados *de novo* son capaces de generar este tipo de respuesta es aún algo difícil de explicar. Las proteínas sintetizadas dentro de las células presentadoras de antígeno profesionales y procesadas como tales son cargadas en CMH-I. Sin embargo, fue reportada la existencia de una vía que, en menor medida, permite que parte de estos péptidos sean cargados en las moléculas CMH-II mediante un mecanismo no convencional [108]. Por lo tanto, nuestros resultados, junto con la evidencia aportada por investigadores que usan la presentación de superficie [172], [173] demuestran que los niveles de anticuerpos más altos para el antígeno heterólogo se logran cuando el antígeno se muestra en la superficie de viriones recombinantes, y el título de anticuerpos generado es directamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en la partícula viral. Si bien no se presentaron formalmente los resultados, los experimentos presentados en el capítulo I también incluyeron un grupo de animales vacunados con un BV diseñado empleando la estrategia clásica de presentación en superficie empleando la fusión de OVA a GP64. En concordancia con lo demostrado por Chapple y Jones [93], la caracterización de esta construcción por *Western blot* demostró que, a las mismas cantidades de BV, la cantidad de antígeno heterólogo incorporada es notablemente menor en comparación con su versión mejorada de presentación no peplomérica en superficie. En los experimentos de respuesta humoral, esta construcción también fue capaz de generar una respuesta inmune mediada por anticuerpos, aunque los mismos fueron detectables luego de la segunda inmunización y el título máximo alcanzado fue de cerca de la mitad del generado por el BV-OVA_{sd}, resultado que apoya el mecanismo clásico de generación de anticuerpos.

La región Fc de las inmunoglobulinas media sus funciones efectoras, como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). En la ADCC, la región Fc de un anticuerpo se une a los receptores Fc (FcγRs) en la superficie de las células efectoras inmunes tales como macrófagos y células NK, lo que conduce a la fagocitosis o lisis de las células diana. En la CDC, los anticuerpos generan una respuesta citotóxica que produce la eliminación de las

células blanco mediante la activación de la cascada del sistema de complemento en la superficie celular. Según su región Fc, las IgG murinas se dividen a su vez en cuatro subclases: IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. El *switch* hacia una u otra subclase depende del tipo de LT que colabore con el LB y del perfil de citoquinas en el entorno.

En consonancia con el perfil de citoquinas inducido por *AcMNPV*, fundamentalmente representado por altos niveles de IFN- γ , los isotipos de inmunoglobulinas específicas para OVA obtenidas en los experimentos del capítulo I reflejaron un perfil sesgado hacia Th1, en concordancia con los resultado obtenidos por otros grupos empleando otros antígenos [97]. Si bien se evidenció un predominio del isotipo IgG2a, también se detectaron inmunoglobulinas IgG1, IgG2b e IgG3. La capacidad de este sistema de generar anticuerpos en su mayoría de la subclase IgG2a podría ser explotada en el diseño de vacunas contra patógenos que no replican en células mieloides o cuya infección podría controlarse mediante respuestas de citotoxicidad dependientes de anticuerpos. Sin embargo, se debe prestar especial atención al diseño de vacunas para los patógenos que podrían beneficiarse de estos mecanismos, fenómeno conocido como ADE (Antibody-Dependent Enhancement (ADE)) [174].

La caracterización de la respuesta contra el vector arrojó un perfil más balanceado de isotipos IgG y fue similar en los grupos inmunizados con las diferentes construcciones y con el BV wt. La presencia de diferentes isotipos asociados a Th1 puede explicarse no sólo por la presencia de motivos CpG en el genoma viral, lo que le permite activar la producción de citoquinas Th1 dentro de las CD por vías dependientes e independientes de TLR9 y MyD88 [42], sino también por impactar directamente en dichas vías dentro de las células B, conduciendo el *switch* de isotipos hacia IG2a, IgG2b e IgG3 [175]. Sin embargo, si bien se evidenció un claro predominio de isotipos asociados a Th1 (mayoritariamente IG2a, luego IgG2b e IgG3), también se hallaron importantes cantidades (aproximadamente el 25% de los anticuerpos detectados) de IgG1, indicando también la participación de LTh2. Esto podría deberse a la mayor proporción y densidad de antígeno en masa de vector, lo que resulta en una dosis muy superior de "antígeno-vector" respecto al antígeno específico OVA. Como se mencionó, en la caracterización de los BV por *Western blot* fue posible

observar una cantidad muy superior de la proteína mayoritaria de superficie, Gp64. Esta proteína aparece concentrada en uno de los extremos del virión, dando lugar a una estructura en forma de espiga, a la cual se denomina “peplómero”. Estas diferencias en cantidad, densidad y distribución de ambos antígenos podría causar la diferencia en el perfil de isotipos observado.

Por otro lado, la activación de LT CD8⁺ requiere la presentación de péptidos en el CMH clase I. Varios autores han utilizado la estrategia de transducción para inducir este tipo de respuestas, aprovechando la capacidad que tienen los BV de transducir células de mamífero. Las nucleocápsides son capaces de escapar de las vesículas endocíticas y alcanzar primero el citosol y luego el núcleo, donde el DNA es transcrito. Las proteínas sintetizadas de *novus* son procesadas en el citoplasma por el proteasoma y los péptidos resultantes son presentados en la superficie de la célula transducida en el contexto de moléculas del CMH de clase I. Si bien esta estrategia emplea la vía clásica y bien caracterizada de presentación de antígenos en moléculas de clase I, los experimentos de respuesta citotóxica *in vivo* empleando el antígeno modelo descritos en esta tesis demostraron que la estrategia de presentación de cápside fue el enfoque más eficaz para inducir respuestas citotóxicas. En el BV-OVAcd, el antígeno OVA es un componente de la cápside de los viriones brotados. De hecho, esta localización impide su reconocimiento por las células B, pero favorece la llegada de OVA al citoplasma de las células presentadoras de antígenos, en particular las células dendríticas. Esta localización citoplasmática permite la degradación en el proteasoma y la consecuente presentación de los péptidos derivados de las proteínas constituyentes de las nucleocápsides de los BV en moléculas de CMH-I. Previamente, hemos demostrado que las células dendríticas pueden presentar de forma cruzada el péptido SIINFEKL derivado de OVA a los LT CD8⁺ [104] y que los baculovirus son potentes inductores de la maduración de las células dendríticas. Debido a que ambos BV, el que presenta OVA en la cápside como el que dirige su expresión bajo el promotor CAG, se inocularon en cantidades similares, puede concluirse que la presentación citosólica parece ser un mecanismo más eficiente para la activación de CD8⁺ que el mecanismo clásico de los polipéptidos sintetizados de *novus*, el cual necesariamente requiere que las nucleocápsides alcancen el núcleo y se desensamblen para permitir allí la

transcripción del DNA por la maquinaria celular. De hecho, varios reportes y resultados aún no publicados de nuestro grupo indican que la cantidad de DNA en el citoplasma de las células transducidas es 100 veces superior al detectado en el núcleo, sugiriendo que la mayoría de las partículas virales son retenidas en el citoplasma [34], [176], [177].

La baja pero significativa respuesta citotóxica generada por la construcción OVA_{sd} puede explicarse por la localización del antígeno en la partícula viral. Luego de la entrada del BV a la célula dendrítica, la fusión de la membrana del virión con la membrana del endosoma mediada por Gp64 permitiría la liberación de la cápside en el citoplasma. Los antígenos presentes en la misma pueden alcanzar el citoplasma, ser procesados por el proteasoma y presentados en moléculas del CMH-I (vía citosólica de presentación cruzada). Por otro lado, los antígenos unidos a la superficie permanecen en la membrana del endosoma pudiendo ser reciclados y procesados en lisosomas para finalmente presentarse de forma cruzada en moléculas de CMH-I, proceso que tendría una eficacia menor (vía vacuolar de presentación cruzada). En conjunto, estos resultados sugieren que el BV-OVA_{sd} podría funcionar como una fuente directa de grandes cantidades de antígeno directo en el citoplasma, lo que le permite explotar la ruta clásica de presentación en clase I [178]. Dado que la síntesis *de novo* por transducción también permite a los antígenos sintetizados alcanzar dicha presentación, estos experimentos, con las dosis y vías ensayadas, permitieron comprobar que el mecanismo de presentación cruzada de antígenos en la cápside viral es más eficiente que la clásica estrategia de transducción.

La comparación *vis a vis* de las diferentes estrategias de *display* en BV permite concluir inequívocamente que la expresión de antígenos en el *cassette* denominado SD es la estrategia que permite obtener mayores niveles de anticuerpos, mientras que la fusión a VP39 dirige la presentación en cápside de los antígenos heterólogos generando la más potente respuesta CTL.

Una vez seleccionados los sistemas de presentación antigénica adecuados para cada tipo de respuesta, el capítulo II describe el estudio del efecto de la formulación de los BV con un representante de cada grupo de los diferentes adyuvantes utilizados habitualmente en vacunas animales.

La generación de una respuesta humoral depende principalmente del reconocimiento directo de los antígenos por los receptores de inmunoglobulina del LB. Por ello, históricamente las estrategias para generar altos niveles de anticuerpos se basaron en la producción del antígeno específico por un lado y su combinación posterior con un inmunoestimulador que permita compensar la falta de señales de peligro que no poseen los antígenos simples y purificados. En este contexto entonces no resultaba trivial evaluar el efecto de la formulación del BV-OVAsd sobre la respuesta humoral generada. Nuestros resultados mostraron que la formulación con los adyuvantes de Freund e $\text{Al}(\text{OH})_3$ modificó el perfil de isotipos hacia Th2, mientras que la formulación con Montanide mostró un perfil más balanceado, con respuestas tanto de perfil de isotipos Th1 y Th2, como fuera reportado en la bibliografía. Además, la formulación con los adyuvantes de Freund y Montanide permitió alcanzar títulos más elevados y más rápidamente, aunque los títulos finales fueron similares a los obtenidos en el experimento de comparación de sistemas de presentación descritos en el capítulo I.

Al analizar el perfil de isotipos contra el vector, fue posible observar una distribución subclases muy similar entre los grupos y similar a su vez con los hallados en el capítulo I. Nuevamente se reveló un predominio de isotipos de perfil Th1, siendo sólo un cuarto de los anticuerpos detectados del tipo IgG1 (perfil Th2). Además, nuevamente fue posible detectar diferencias entre el perfil de Ig contra el vector respecto a los anticuerpos contra el antígeno específico. Al analizar el perfil de isotipos para el antígeno OVA, se evidenció una relación invertida con predominancia de isotipos Th2 en los sueros de los animales inmunizados con las formulaciones empleando los clásicos adyuvantes $\text{Al}(\text{OH})_3$ o Freund, lo que se condice con los resultados obtenidos para numerosas vacunas a lo largo de la extensa historia de estos adyuvantes. Ya ha sido mencionado que probablemente la formulación del BV-OVA con estos adyuvantes altere su estructura o cambie la vía de entrada en una CD, y por tanto sus propiedades inmunomoduladoras. La alteración de la estructura puede derivar en una separación física del antígeno que se encuentra en la membrana del virión brotado del resto de la partícula viral. El antígeno podría entonces combinarse con el adyuvante, tal como lo haría un antígeno suministrado como proteína soluble. Por otro lado, suponiendo que la estructura del virión no hubiese sido alterada, la

asociación física con otra sustancia posiblemente genere un cambio en la vía de entrada, sea por impedimento estérico de Gp64 con los receptores celulares o por la generación de estructuras BV-adyuvante de mayor tamaño que necesariamente deben ser incorporadas por otras vías. El grupo inmunizado con la formulación conteniendo Montanide 802 presentó una relación Th2/Th1 cercana a 1. Este adyuvante había sido utilizado para la preparación de vacunas contra fiebre aftosa que apenas 7 dpi mostraron excelentes niveles de protección acompañados de la producción de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 [179].

Así, el análisis de los sueros de los animales inmunizados con los baculovirus recombinantes que transportan antígenos heterólogos en su superficie en presencia o ausencia de adyuvantes permitió evidenciar la capacidad que tienen los vectores baculovirales de estimular respuestas inmunes humorales *per se*, aunque el perfil de isotipos puede ser modificado mediante su formulación.

Por otro lado, se estudio el efecto de la formulación sobre la respuesta celular citotóxica. En todos los casos, la adición de adyuvantes anuló por completo la capacidad del BV-OVAcd para montar una respuesta CTL. Como fue demostrado por Hervas [43], la generación de respuesta CTL requiere de la integridad y funcionalidad del virión brotado. Por lo tanto, la muy marcada reducción en la respuesta obtenida con los diferentes adyuvantes podría deberse a una alteración física de la partícula viral con el consecuente impacto en su capacidad de presentación multimérica del antígeno, a un cambio en la vía de entrada del virus en la célula presentadora y/o también a un deterioro de su capacidad de madurar CD. Como se mencionó, la formulación de cualquier activo con el adyuvante incompleto de Freund constituye una emulsión que involucra la formación de micelas entre una fase oleosa (el adyuvante) y una acuosa (el componente farmacológicamente activo) a la que previamente se le agrega el detergente Tween 40. Los BV brotados adquieren su envoltura de la membrana plasmática de las células infectadas y por tanto, cualquier combinación de los mismos con sustancias de naturaleza lipídica o detergentes puede alterar drásticamente la misma. De hecho, la titulación en células de insecto de la fase acuosa recuperada al romper por centrifugación la emulsión no arrojó títulos virales detectables. Por otro lado, la titulación de BV mezclados con hidróxido de aluminio (adyuvante de fase

acuosa) permitió detectar títulos virales tras la formulación, aunque el orden fue de 2 a 3 veces menor al control sin formular. El mecanismo de acción de los compuestos de aluminio depende fundamentalmente del efecto de depósito y la generación de inflamación local lo que estimula el reclutamiento de células del sistema inmune. Las células presentadoras que llegan al sitio se encuentran entonces con un antígeno atrapado en partículas del orden de los nm, lo que permite prolongar el tiempo de interacción y aumentar la captación del mismo. Las CPA, como los macrófagos y las células dendríticas, pueden incorporar los antígenos que se van liberando al líquido intersticial por pinocitosis. Además los antígenos que permanecen adsorbidos a las partículas de adyuvante pueden ser incorporados a las CPA por fagocitosis. Por otro lado, las sales de aluminio tienen también actividad inmunoestimuladora directa, favoreciendo la maduración de las células dendríticas. Como resultado, estos compuestos estimulan respuestas de perfil Th2. Finalmente, el adyuvante Montanide IMS 12802 es una dispersión acuosa de partículas de tamaño entre 50 y 500nm y contiene compuestos inmunoestimulatorios reconocidos como seguros (sustancias GRAS). Aunque es difícil hipotetizar el mecanismo debido a la falta de información sobre su composición, la formulación con este adyuvante también demostró ser perjudicial para la actividad potenciadora de respuesta CTL intrínseca de los BV. Esto podría estar relacionado con un cambio en la vía de entrada en la CD por la presencia de estas partículas, lo cual además podría impedir escape de las nucleocápsides al citoplasma como consecuencia de un impedimento estérico en el proceso de fusión de las membranas del BV y del endosoma.

En conjunto, nuestros resultados demuestran que la localización del antígeno y la integridad y funcionalidad de la partícula viral son esenciales para provocar respuestas humorales o celulares contra el antígeno heterólogo vectorizado por *AcMNPV*, siendo los adyuvantes ensayados irrelevantes o incluso perjudiciales para las respuestas inmunitarias específicas estimuladas por el virión brotado.

Habiendo profundizado el conocimiento sobre la capacidad de los distintos vectores baculovirales, el capítulo III se centró en la aplicación de las conclusiones obtenidas empleando el antígeno modelo OVA en el diseño de un candidato vacunal contra FMDV.

En esta tesis se seleccionaron antígenos basados en la secuencia de la cepa de campo A/Arg/2001. Ya ha sido discutida la importancia tanto de la generación de anticuerpos [57], [50], [51], [54]–[56] como del posible aporte de la respuesta celular citotóxica al *clearance* viral en los animales infectados de manera persistente [154], [155] [58]–[61]. En este sentido, la selección de los antígenos conteniendo epitopes B a ser insertados en el *cassette* SD se basó en el profundo conocimiento de los sitios antigénicos descritos como inductores de anticuerpos neutralizantes. Asimismo, esta tesis se nutrió del conocimiento que previamente había generado nuestro grupo. Mediante la estrategia clásica de *display* empleando GP64, Tami y colaboradores construyeron y caracterizaron BV que transportaban el sitio antigénico A del serotipo C o la poliproteína P1 completa en la superficie del virión, logrando importantes niveles de anticuerpos neutralizantes [19], [20]. Debido a la baja eficiencia de incorporación de la poliproteína P1 en comparación a la fusión que contenía solo el sitio A, y teniendo en cuenta que habían sido reportados nuevos sitios antigénicos en VP1, Peralta y colaboradores [180] generaron nuevas construcciones diseñadas para presentar la proteína VP1 completa. En este caso, se empleó también la estrategia de presentación en superficie mediada por el *cassette* SD. Todas las construcciones se expresaron correctamente en las células infectadas pero en aquellas que contenían la VP1 completa la proteína de fusión no fue incorporada en los viriones. El análisis *in silico* empleando predictores de señales de localización/retención subcelular (TargetPfrom: <http://www.cbs.dtu.dk/services>) no hallaron potenciales señales crípticas. La caracterización por microscopia confocal permitió comprobar el tránsito de la fusión por el sistema de endomembranas pero sólo las construcciones que contenían el sitio A alcanzaron a la membrana celular, indicando que no se trató de un impedimento en la incorporación en el virión sino de una incapacidad de la proteína de fusión de llegar correctamente a la membrana celular [180].

Asimismo, desde hace muchos años se generan y aplican los avances en el estudio de los epitopes relevantes, en particular mediante el empleo de secuencias en tándem. Capozzo y colaboradores [162] obtuvieron buenos resultados al inmunizar ganado con vacunas a DNA y peptídicas producidas mediante el sistema BV-células de insecto. En ambos casos las vacunas contenían varias repeticiones del sitio A. Más recientemente se han desarrollado

vacunas a péptidos dendriméricos conteniendo epitopes B, cuyas respuestas fueron mejoradas por el agregado de epitopes T [181], [182].

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este trabajo de tesis se redirigieron los esfuerzos hacia el desarrollo de un antígeno quimérico que contuviera epitopes inmunológicamente relevantes, potenciando su capacidad mediante la presencia de múltiples copias y excluyendo a su vez secuencias innecesarias que puedan derivar en la incapacidad de la proteína quimérica de incorporarse a la superficie del virión brotado. Así, se diseñó un antígeno quimérico multiepitópico denominado AgME conteniendo tres copias del Sitio A (aa 14 a 160 de VP1), dos copias del Sitio C (aa 200 a 213 de VP1) y una copia de los de aa 41 a 60 de VP1, flanqueado por los sitios únicos de restricción que permiten su inserción en el cassette SD. La secuencia final denominada AgMEsd, representando una unidad transcripcional que involucra el péptido señal de GP64, el antígeno multiepitópico y el dominio transmembrana y citosólico (TM/CTD) de G-VSV, fue analizada *in silico*, demostrando no contener señales predichas de retención en compartimentos subcelulares ni secuencias blanco de glicosilación.

Por otro lado, debido a la falta de reportes previos de epitopes CD8+ para la cepa A2001, la selección de la proteína a ser presentada en cápside se basó en la predicción *in silico* de potenciales péptidos de unión a moléculas de clase I para las diferentes proteínas estructurales. Nuestro grupo había desarrollado previamente un BV que transportaba la proteína VP1 en la cápside, con el que se obtuvieron niveles de protección en ausencia de anticuerpos de aproximadamente el 20% (Molinari P., datos no publicados). El análisis *in silico* de todas las secuencias arrojó mejores resultados para la proteína VP2, por lo que fue seleccionada para su incorporación en la cápside. La evaluación de su capacidad para generar respuestas citotóxicas específicas se realizó empleando dos estrategias diferentes. Como primera aproximación, se realizó un experimento de respuesta citotóxica *in vivo*, tal como los realizados en los capítulos I y II pero utilizando el péptido que mayor *score* había obtenido en el análisis bioinformático. Además del grupo control, otros dos grupos de ratones fueron inmunizados empleando el BV-VP2cd o una mezcla de BV wt con cápsides purificadas de A/Arg/2001. Se emplearon las mismas dosis que las utilizadas en el capítulo

I. El experimento no arrojó resultados positivos. Si bien esta estrategia ya había sido empleada por otros grupos para identificar péptidos de clase I, en todos los casos se emplearon varios *pools* de péptidos de diferentes secuencias *core*, cada una de las cuales a su vez estaba rodeada por uno o dos aminoácidos más o menos en el extremo N y C terminal. Cuando un *pool* daba respuesta, posteriormente se analizaban los péptidos del grupo en forma individual. Por limitaciones económicas no fue posible realizar esta aproximación. Sin embargo, dado que resultaba de interés conocer el aporte de la presencia de un antígeno en la cápside a la protección, realizamos un experimento de desafío al día 7 post vacunación, lo que coincide con los mayores niveles de respuesta citotóxica. Dicho experimento permitió comprobar que, a las dosis ensayadas, la presentación de la proteína VP2 en la cápside del baculovirus permitió obtener un 50% de protección. Así, a pesar de no estar descripto como el principal mecanismo involucrado en la protección, el aporte de la respuesta generada por un antígeno en la cápside y en ausencia de anticuerpos específicos es significativo.

Por otro lado, se caracterizó la construcción que posee el multiantígeno basado en epitopes B en el *cassette* SD. Mediante microscopía de fluorescencia confocal fue posible comprobar la capacidad de la proteína de fusión de localizarse en la membrana de las células de insecto. El *Western blot* de una muestra concentrada del sobrenadante de infección demostró la presencia del antígeno en el virión brotado y confirmó su localización en el virión brotado. Al analizar por ensayos de ELISA de captura indirectos los sueros de los ratones Balb/c inmunizados con dicho baculovirus fue posible detectar niveles estadísticamente significativos de anticuerpos específicos.

Si bien la caracterización de las construcciones permitió comprobar la obtención de los virus deseados, es importante destacar algunas observaciones. La expresión e incorporación a los BV de VP2 como fusión a VP39 fue notablemente superior a su equivalente con el antígeno modelo. Esto podría también haber influido en la potencia de la respuesta protectora generada por el BV-VP2cd en el experimento de desafío con una única dosis. Por otro lado, las infecciones realizadas con todas las construcciones que contenían el AgME presentaban numerosas células con avanzados signos de infección al tercer día post infección, a pesar de haberse empleado baja *moi*. Adicionalmente, las inmunomicroscopías

mostraron también una menor cantidad de células marcadas y una menor intensidad de marca. Sin embargo, esto no parece haber alterado los títulos obtenidos. Existen algunos reportes previos de expresión en superficie de motivos RGD en Gp64 que permitieron incrementar la eficiencia de transducción de células de mamífero por los BV que los transportaban [183]. Quizás este mismo efecto pueda producirse en las infecciones en células de insecto, aún más pronunciado por el tropismo natural y por las características de nuestra construcción, permitiendo explicar las observaciones realizadas en cuanto al efecto citopático típico de estas infecciones. Asimismo, el rol natural de estos dominios en las interacciones célula-célula y célula-matriz podría verse afectado por la excesiva sobreexpresión de numerosas copias y en tándem de nuestra construcción.

Finalmente, y con el objetivo de combinar ambas respuestas en un único candidato vacunal, se construyó y caracterizó el BV-AgMEsdVP2cd. Los resultados obtenidos mediante *Western blot* confirmaron que este BV incorporó ambos antígenos a la partícula viral y que la localización de cada uno de ellos coincidió con lo esperado. La evaluación de la capacidad inmunogénica de este BV se realizó mediante un experimento de desafío letal empleando ratones C57BL/6J. Dicho modelo tiene una ventana de susceptibilidad al desafío que no es compatible con los esquemas de inmunización de 3 dosis, una cada 2 a 3 semanas, empleados para evaluar la respuesta humoral en los experimentos anteriores. A fin de compensar la ausencia de una dosis y la reducción en el tiempo entre las dos restantes, se utilizaron dosis conteniendo cantidades de baculovirus 1 orden superior. Por otro lado, un cuarto grupo de animales fue inmunizado con PBS. De manera inesperada, todos los animales que recibieron dos dosis elevadas de BV, transportaran o no los antígenos específicos, sobrevivieron al desafío. Así, resulta evidente que, a la dosis de desafío empleada, la potente respuesta innata generada por el vector parece haber sido suficiente para conferir protección. Ya se mencionó que varios grupos de investigación, incluido el nuestro, han explorado esta propiedad para conferir protección a animales frente a desafíos letales con diferentes patógenos hasta unos pocos días pos vacunación. Dado que el objetivo fue evaluar la respuesta adaptativa específica, en todos los experimentos de desafío realizados en esta tesis, el virus aftoso fue inoculado 7 días después de la inmunización con BV, tiempo al que se había comprobado la ausencia de respuesta innata protectora. Sin

embargo, el aumento de la carga de BV empleada y/o la aplicación de una segunda dosis parecen haber ampliado el período de ventana de protección enmascarando el aporte de la respuesta específica humoral y celular. Trabajos recientes reportaron la existencia de mecanismos a través de los cuales es posible aumentar la intensidad o duración de respuestas innatas mediante la aplicación de más de una dosis de inmunógeno. Este efecto *booster* podría perfectamente explicar los resultados obtenidos en este experimento. En particular, ensayos de evaluación de la respuesta innata producida por baculovirus en ratones mostraron que, tras una segunda dosis, los niveles de IFN- γ secretados y el de células NK positivas para esta citoquina estuvieron significativamente aumentados (Molinari, datos no publicados). De hecho, en los últimos años se ha producido una explosión en el descubrimiento de características, propiedades y funciones de las células NK más semejantes a las que poseen las células del sistema inmune adaptativo. Estas similitudes incluyen la expresión de los genes activadores de la recombinación (RAG) durante la ontogenia [184] y un proceso de educación durante el desarrollo, análogo al desarrollo de células T en el timo [185]. Dado que se creía que las células del sistema inmune innato, incluidas las células NK, carecían de procesos de reorganización somática de sus genes receptores, era concluyente que estas células no tenían especificidad de antígeno y por lo tanto no eran capaces de desarrollar memoria inmunológica clásica como lo hacen las células del sistema inmune adaptativo. El descubrimiento de receptores activadores codificados por la línea germinal de las células NK capaces de unirse directamente a antígenos derivados de patógenos fue sin duda el primer gran paso. En un modelo experimental que empleó células derivadas de ratones y citomegalovirus (CMV) se demostró la expansión de células NK específicas para el virus durante la fase aguda de la infección [186]–[188]. Asimismo, recientemente se observó que las células NK también pueden adquirir cualidades funcionales comúnmente asociadas con la generación de memoria en respuesta a patógenos y en entornos no infecciosos.

Después del control de la infección, las células NK efectoras expandidas sufren una fase de contracción necesaria para establecer un *pool* de células de memoria de vida duradera y autorrenovables (memoria central) y un *pool* de células específicas de antígeno que pueden recuperarse muchos meses después de la infección en una variedad de tejidos periféricos

(memoria efectora) [189]. En comparación con las células NK *naïve*, estas células NK de memoria muestran un perfil de transcripcional diferente [190] y, en comparación con las células NK *naïve* de ratones no infectados, poseen atributos funcionales semejantes a los asociados con las células T de memoria, como la expansión secundaria, función efectora mejorada *ex vivo* y mayor protección contra el desafío de virus [189]. También existe evidencia de que la formación de memoria de células NK es específica del virus y depende de la interacción con el antígeno viral [189]. En consonancia con lo observado en este sistema, otros grupos encontraron resultados semejantes empleando otros virus [191], [192] o incluso otros modelos animales [193], [194]. En conjunto, estos estudios apoyan colectivamente las respuestas de memoria NK en varios modelos virales adicionales pero están limitadas por interacciones desconocidas entre receptores de células NK y antígenos codificados por patógenos afines que median estas respuestas. Por lo tanto, la identificación de antígenos virales y sus correspondientes receptores en las NK que median las respuestas mejoradas en estos modelos fortalecerán aún más el concepto de memoria de células NK específicas de antígeno. En conjunto, estos resultados demuestran que las células NK, como las células T CD8 +, experimentan activación, expansión y contracción específica de antígeno para generar células de memoria de larga vida en respuesta a la infección viral, lo que contribuye a generar respuestas protectoras de larga duración. Asimismo, se descubrió que las citoquinas proinflamatorias son importantes en el proceso de generación de memoria y reclutamiento. Incluso, se hallaron algunos indicios de que las señales proinflamatorias por sí solas serían suficientes para generar células NK con propiedades de memoria [195]. Específicamente, las células NK activadas por citoquinas mostraron una producción mejorada de IFN- γ después de la estimulación *ex vivo* con las citoquinas evaluadas o luego de la activación del receptor empleando el ligando específico. Esta producción mejorada de IFN- γ pudo ser detectada por hasta 4 semanas, y en menor grado hasta 12 semanas. Esta función efectora mejorada se ha demostrado que es intrínseca a la célula, y la evidencia adicional sugiere que la producción mejorada de IFN- γ de las células preactivadas también son heredadas a su progenie [196]. A diferencia de la memoria generada por la interacción "receptor-antígeno" observada para CMV, las células NK activadas por citoquinas no muestran una citotoxicidad potenciada tras la reestimulación

[196]. Estos resultados sugieren que la memoria NK inducida por citoquinas genera células funcionalmente distintas de las células de memoria inducidas por CMV, es decir, antígeno específicas. Sin embargo la prolongada longevidad y la producción mejorada de IFN- γ pueden ser inducidas por la sola estimulación con citoquinas. Si bien estos resultados fueron realizados *ex vivo*, ya se reportaron algunos indicios de que esto también sería posible en un entorno fisiológico [197]

Teniendo en cuenta que los BV son potentes estimuladores de las células del sistema inmune innato, e inductores de altos niveles de citoquinas proinflamatorias, es probable que la inmunización con múltiples y elevadas dosis empleada en el último experimento de desafío hayan generado potentes respuestas innatas capaces de proteger frente al desafío viral incluso 7 días después de la última inmunización.

CONCLUSIONES

Las diferentes estrategias de presentación permiten dirigir el tipo de respuesta contra el antígeno vectorizado. La comparación de las diferentes estrategias de presentación *vis a vis* demostró que la presentación en cápside constituye la mejor estrategia para montar una respuesta celular citotóxica específica, evidenciando que la presentación cruzada en células dendríticas es un mecanismo más eficiente que la transducción. Por otro lado, el *display* en toda la superficie del virión brotado constituye la mejor estrategia para generar anticuerpos, cuyos títulos pueden incrementarse a través de la aplicación de dosis de refuerzo.

La formulación de los BV con los adyuvantes ensayados no potencia significativamente la respuesta humoral obtenida y va en detrimento de los mecanismos de presentación y sus propiedades adyuvantes naturales para montar potentes respuestas citotóxicas.

La aplicación de los conocimientos adquiridos con el antígeno modelo permitió diseñar BV recombinantes que transportan antígenos específicos de A/Arg/2001 y que fueron capaces de montar respuestas inmunes, demostrando su potencialidad. La inmunización de ratones con el BV-VP2, que posee epitopes clase I putativos en la cápside y que inducen una respuesta exclusivamente celular citotóxica, permite alcanzar niveles de protección del 50% frente a un desafío letal. Por otro lado, el BV-AgME que contiene múltiples epitopes B en su superficie fue capaz de generar anticuerpos específicos conformacionales.

Las potentes propiedades estimuladoras de respuesta innata que poseen estos vectores virales tienen el potencial de controlar la infección a tiempos tempranos post vacunación. Esta respuesta inmune innata de efectiva capacidad antiviral puede prolongarse empleando dosis repetidas y/o concentradas de vectores baculovirales, posiblemente por su impacto en los mecanismos de memoria inmunológica de las células involucradas en la respuesta.

Finalmente, el BV dual permite combinar las propiedades estimuladoras del sistema inmune innato, su capacidad de transportar antígenos permitiendo generar respuestas adaptativas humorales y celulares y su seguridad de producción, constituyendo así un candidato vacunal promisorio en escenarios de erradicación.

ANEXOS

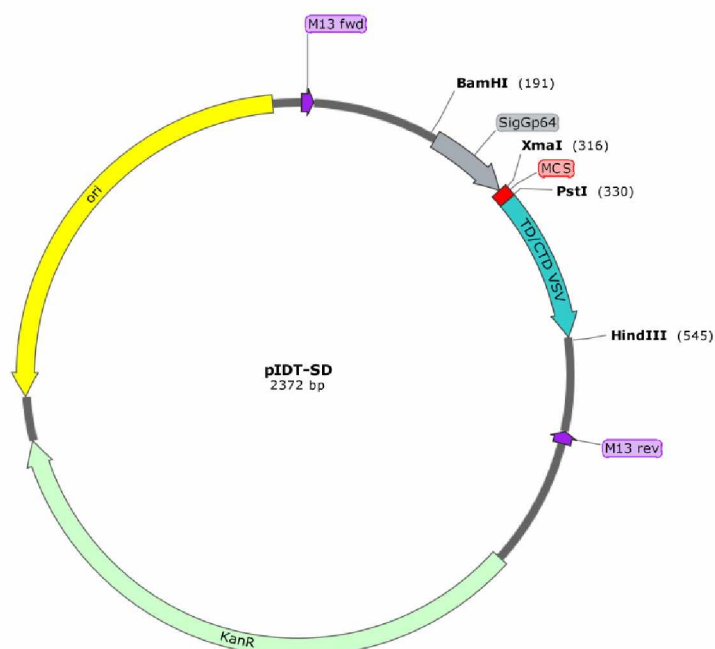
BIBLIOGRAFIA

ANEXOS

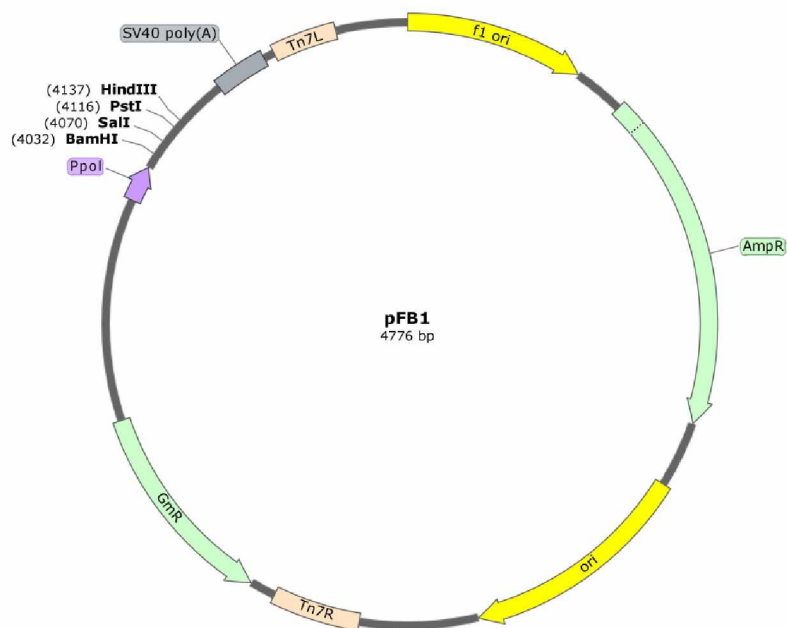
Secuencia del *cassette* SD



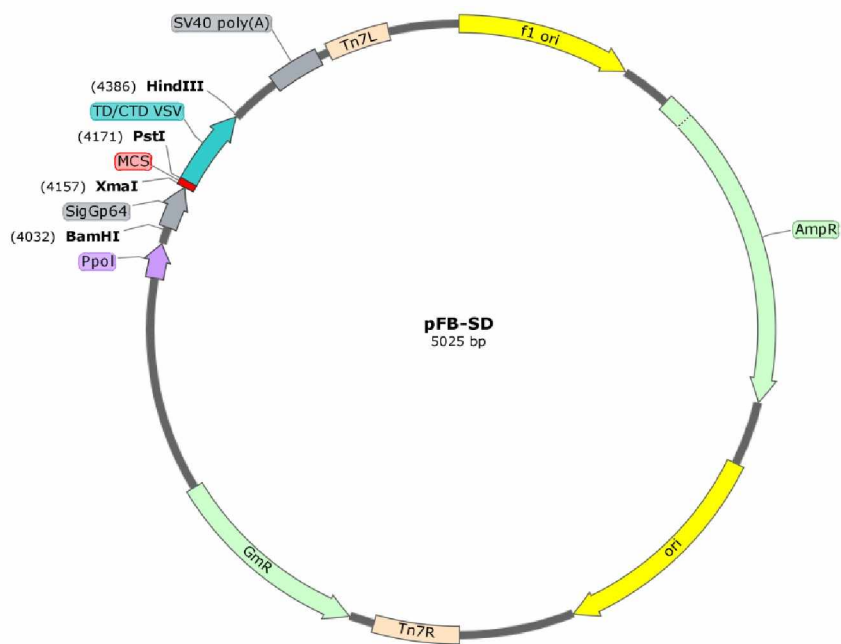
Vector pIDT-SD



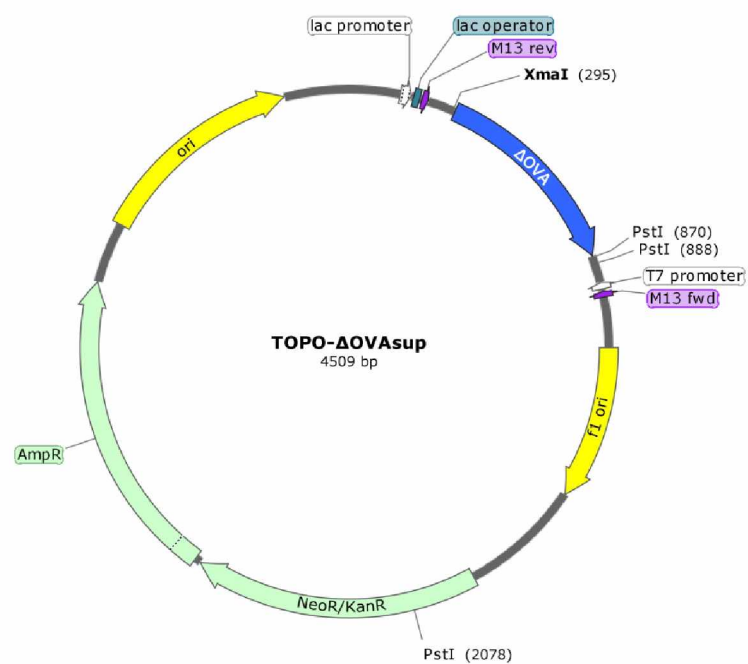
Vector pFB1



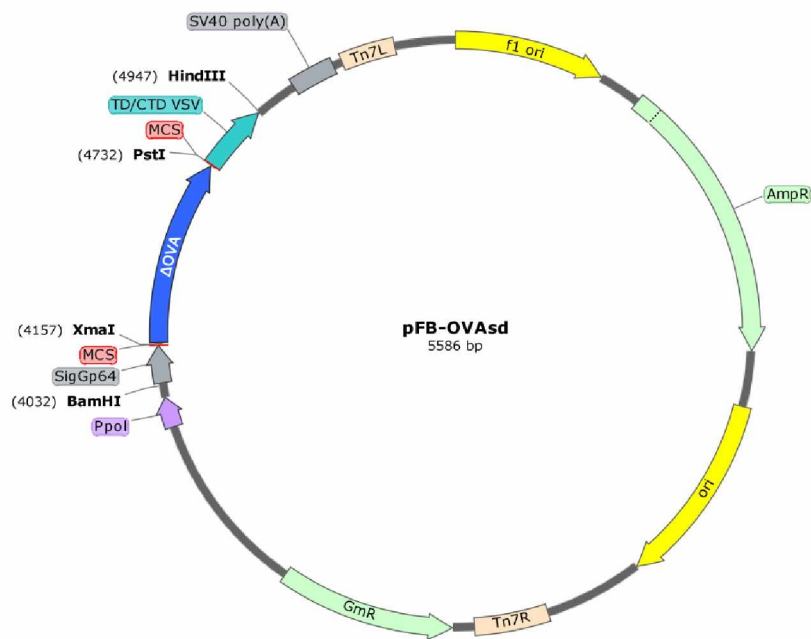
Vector pFB-SD



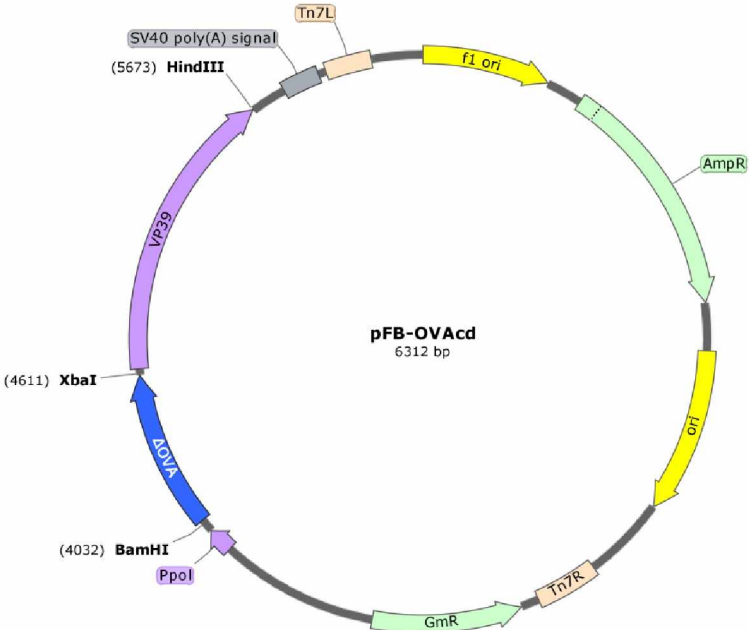
Vector TOPO-ΔOVA_{sup}



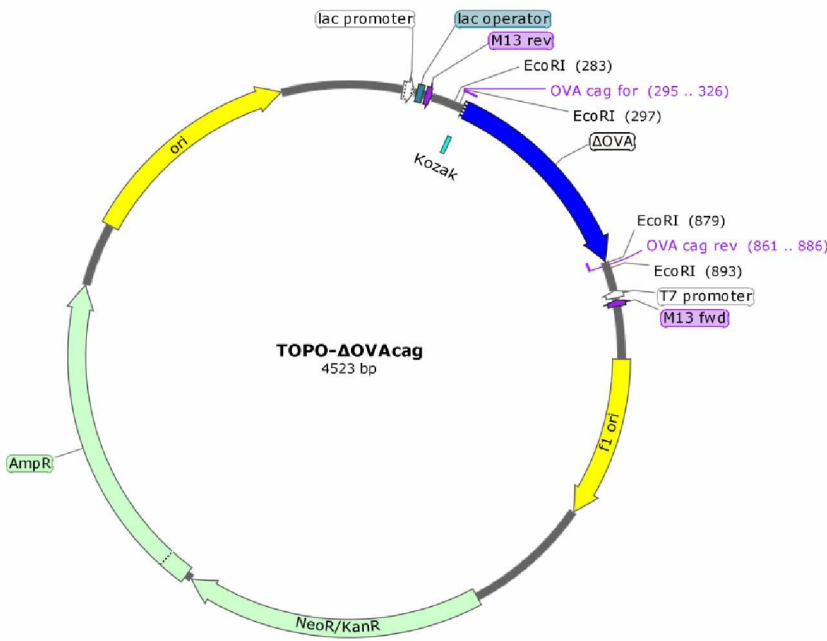
Vector pFB-OVAsd



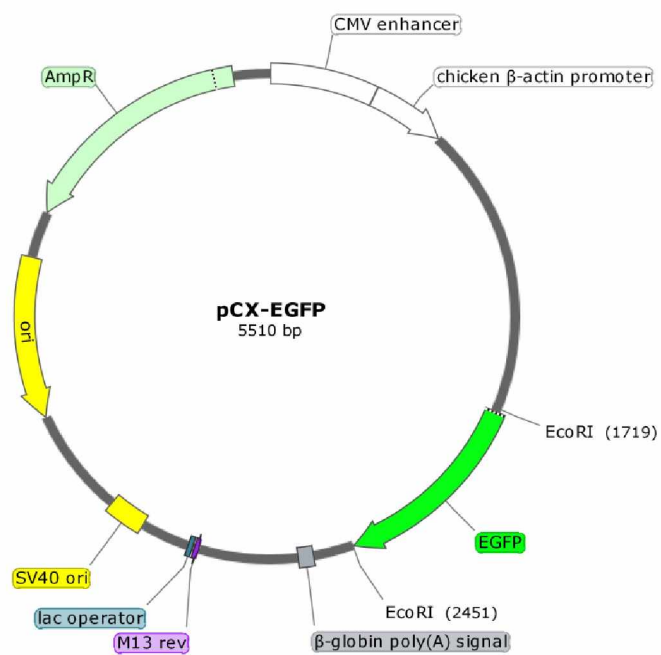
Vector pFB-OVAccl



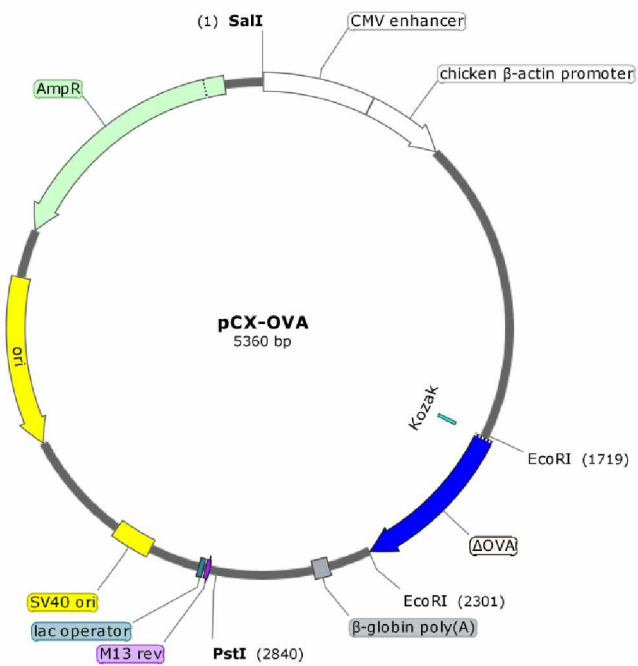
Vector TOPO-ΔOVAcag



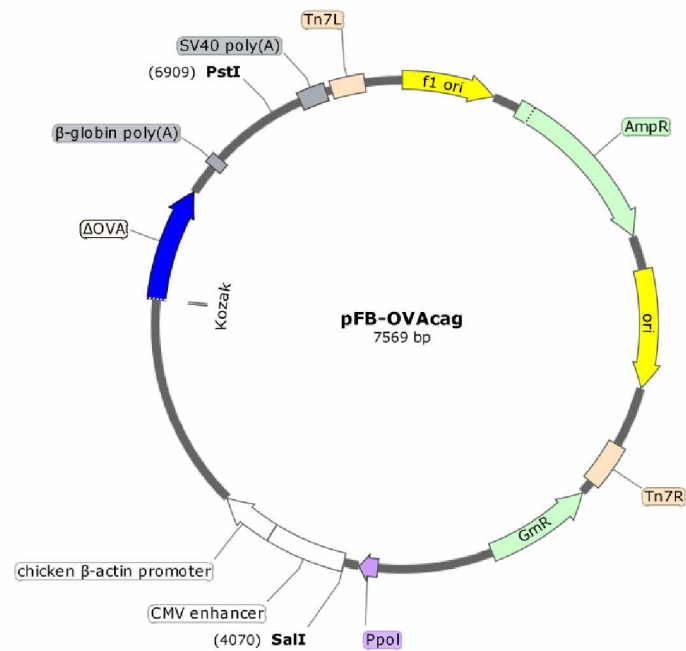
Vector pCX-EGFP



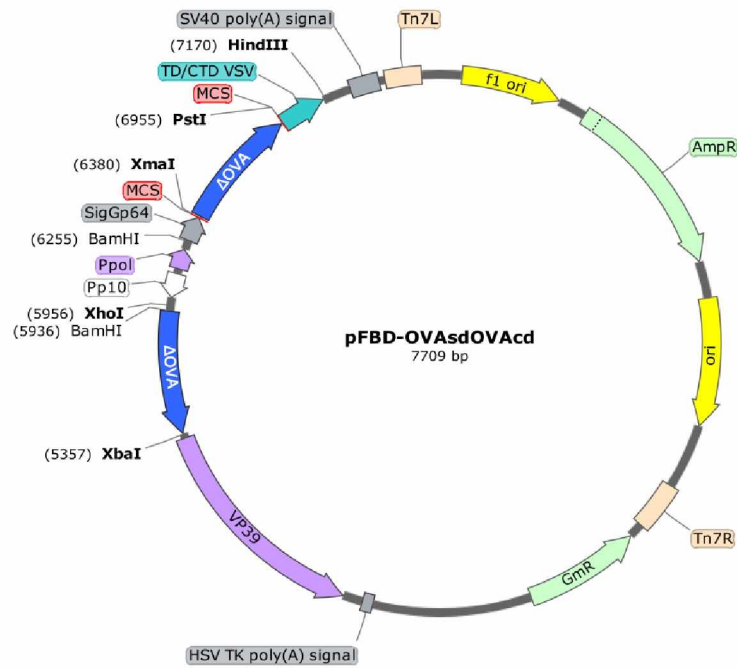
Vector pCX-OVA



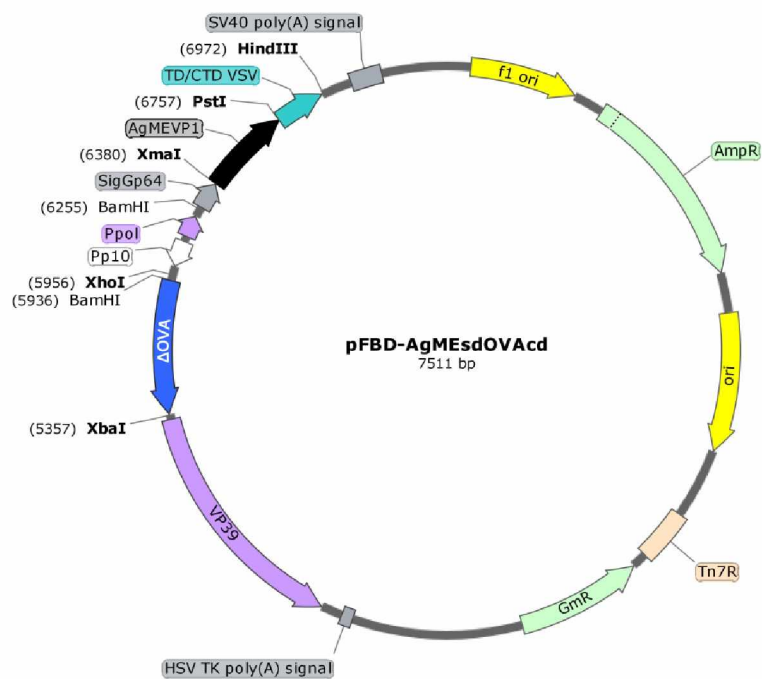
Vector pFB-OVAcag



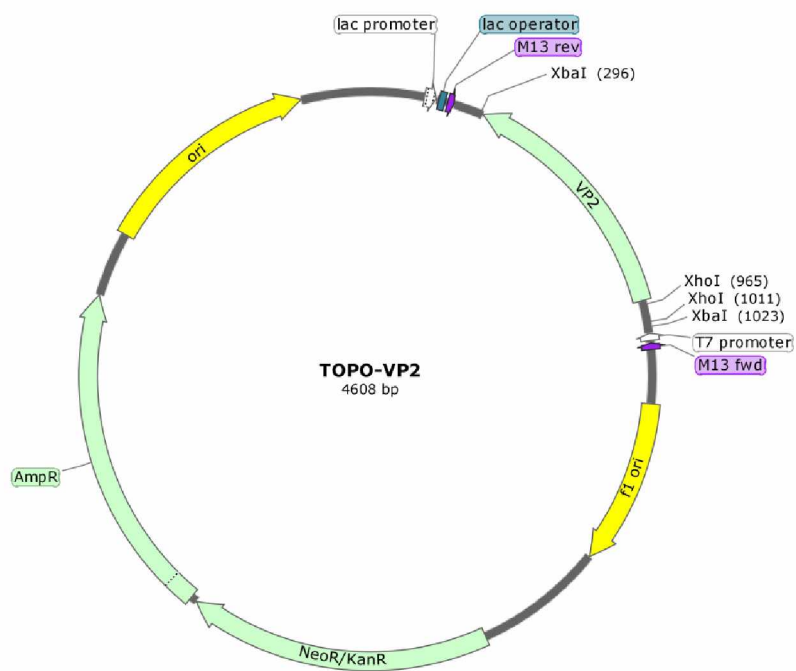
Vector pFBD-OVAsdOVAccl



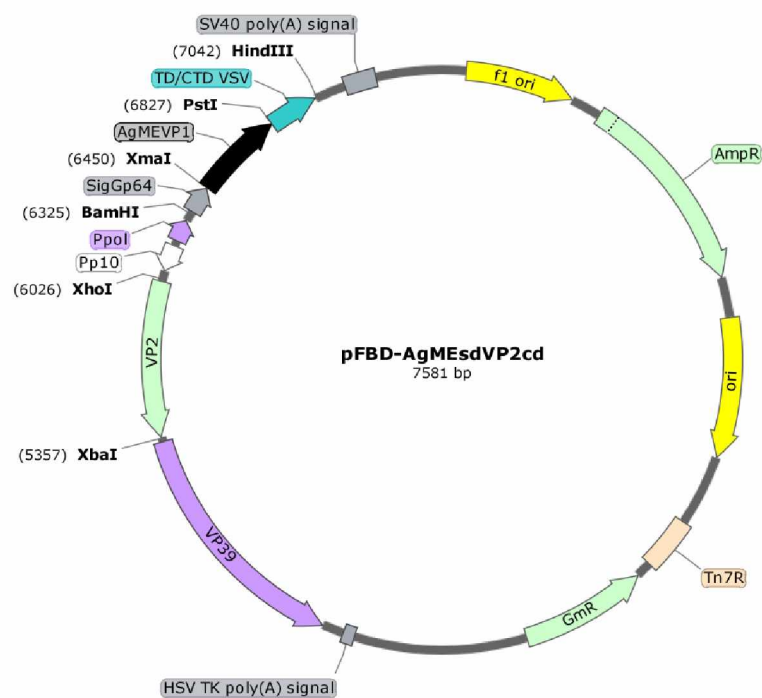
Vector pFBD-AgMEsdOVAcD



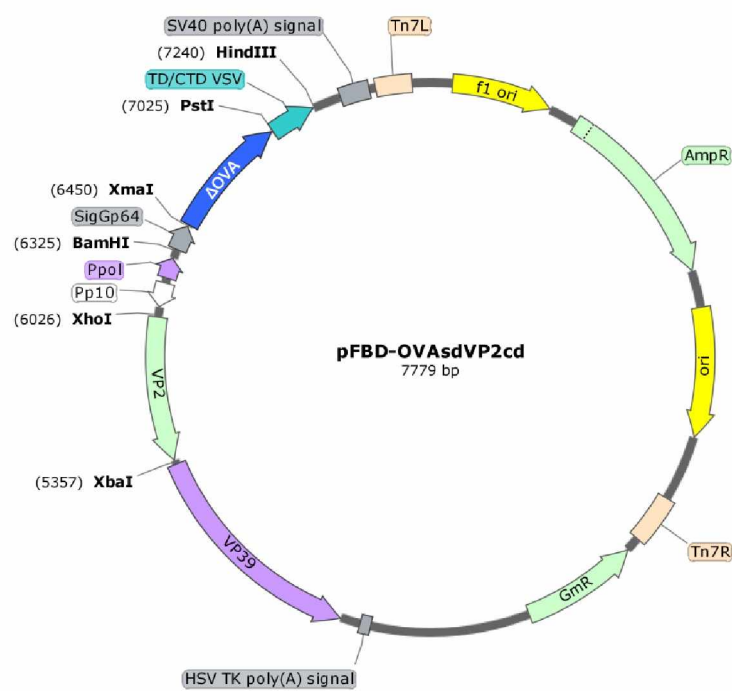
Vector TOPO-VP2



Vector pFBD-AgMEsdVP2cd



Vector pFBD-OVAsdVP2cd



BIBLIOGRAFÍA

- [1] S. L. Swain, K. K. McKinstry, and T. M. Strutt, "Expanding roles for CD4 + T cells in immunity to viruses," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 12, no. 2, pp. 136–148, 2012.
- [2] M. P. Broekhuijsen *et al.*, "Fusion proteins with multiple copies of the major antigenic determinant of foot-and-mouth disease virus protect both the natural host and laboratory animals," *J Gen Virol*, vol. 68 Pt 12, pp. 3137–3143, 1987.
- [3] R. DiMarchi, G. Brooke, C. Gale, V. Cracknell, T. Doel, and N. Mowat, "Protection of cattle against foot-and-mouth disease by a synthetic peptide," *Science*, vol. 232, no. 4750, pp. 639–641, 1986.
- [4] A. Berinstein, M. Perez Filgueira, A. Schudel, P. Zamorano, M. Borca, and A. Sadir, "Avridine and LPS from *Brucella ovis*: effect on the memory induced by foot-and-mouth disease virus vaccination in mice," *Vaccine*, vol. 11, no. 13, pp. 1295–1301, 1993.
- [5] A. G. Allison and G. Gregoriadis, "Liposomes as immunological adjuvants," *Nature*, vol. 252, no. 5480, p. 252, 1974.
- [6] N. el Guink, R. M. Kris, G. Goodman-Snitkoff, P. A. Small Jr., and R. J. Mannino, "Intranasal immunization with proteoliposomes protects against influenza," *Vaccine*, vol. 7, no. 2, pp. 147–151, 1989.
- [7] R. Lifshitz, C. Gitler, and E. Mozes, "Liposomes as immunological adjuvants in eliciting antibodies specific to the synthetic polypeptide poly(LTyr, LGlu)-poly(DLAla)--(LLys) with high frequency of site-associated idiotypic determinants," *Eur J Immunol*, vol. 11, no. 5, pp. 398–404, 1981.
- [8] S. E. Crawford, M. Labbe, J. Cohen, M. H. Burroughs, Y. J. Zhou, and M. K. Estes, "Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells," *J Virol*, vol. 68, no. 9, pp. 5945–5952, 1994.
- [9] M. J. Redmond *et al.*, "Rotavirus particles function as immunological carriers for the delivery of peptides from infectious agents and endogenous proteins," *Mol Immunol*, vol. 28, no. 3, pp. 269–278, 1991.

-
- [10] T. J. French, J. J. Marshall, and P. Roy, "Assembly of double-shelled, viruslike particles of bluetongue virus by the simultaneous expression of four structural proteins," *J Virol*, vol. 64, no. 12, pp. 5695–5700, 1990.
- [11] P. Pumpens, G. P. Borisova, R. A. Crowther, and E. Grens, "Hepatitis B virus core particles as epitope carriers," *Intervirology*, vol. 38, no. 1–2, pp. 63–74, 1995.
- [12] S. Kajigaya *et al.*, "Self-assembled B19 parvovirus capsids, produced in a baculovirus system, are antigenically and immunogenically similar to native virions," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 88, no. 11, pp. 4646–4650, 1991.
- [13] F. Boisgerault, G. Moron, and C. Leclerc, "Virus-like particles: a new family of delivery systems," *Expert Rev Vaccines*, vol. 1, no. 1, pp. 101–109, 2002.
- [14] R. Noad and P. Roy, "Virus-like particles as immunogens," *Trends Microbiol*, vol. 11, no. 9, pp. 438–444, 2003.
- [15] C. Sedlik, M. Saron, J. Sarraseca, I. Casal, and C. Leclerc, "Recombinant parvovirus-like particles as an antigen carrier: a novel nonreplicative exogenous antigen to elicit protective antiviral cytotoxic T cells," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 94, no. 14, pp. 7503–7508, 1997.
- [16] C. Ludwig and R. Wagner, "Virus-like particles-universal molecular toolboxes," *Curr Opin Biotechnol*, vol. 18, no. 6, pp. 537–545, 2007.
- [17] V. G. Moron, P. Rueda, C. Sedlik, and C. Leclerc, "In vivo, dendritic cells can cross-present virus-like particles using an endosome-to-cytosol pathway," *J Immunol*, vol. 171, no. 5, pp. 2242–2250, 2003.
- [18] W. Ernst, R. Grabherr, D. Wegner, N. Borth, A. Grassauer, and H. Katinger, "Baculovirus surface display: construction and screening of a eukaryotic epitope library," *Nucleic Acids Res*, vol. 26, no. 7, pp. 1718–1723, 1998.
- [19] C. Tami, M. Farber, E. L. Palma, and O. Taboga, "Presentation of antigenic sites from foot-and-mouth disease virus on the surface of baculovirus and in the membrane of infected cells," *Arch Virol*, vol. 145, no. 9, pp. 1815–1828, 2000.
- [20] C. Tami, A. Peralta, R. Barbieri, A. Berinstein, E. Carrillo, and O. Taboga, "Immunological properties of FMDV-gP64 fusion proteins expressed on SF9 cell and baculovirus surfaces," *Vaccine*, vol. 23, no. 6, pp. 840–845, 2004.

- [21] S. Yoshida *et al.*, "Baculovirus virions displaying Plasmodium berghei circumsporozoite protein protect mice against malaria sporozoite infection," *Virology*, vol. 316, no. 1, pp. 161–170, 2003.
- [22] M. M. Rahman, M. S. Shaila, and K. P. Gopinathan, "Baculovirus display of fusion protein of Peste des petits ruminants virus and hemagglutination protein of Rinderpest virus and immunogenicity of the displayed proteins in mouse model," *Virology*, vol. 317, no. 1, pp. 36–49, 2003.
- [23] D. H. Yu, X. D. Hu, and H. Cai, "A combined DNA vaccine encoding BCSP31, SOD, and L7/L12 confers high protection against Brucella abortus 2308 by inducing specific CTL responses," *DNA Cell Biol*, vol. 26, no. 6, pp. 435–443, 2007.
- [24] G. Moron, P. Rueda, I. Casal, and C. Leclerc, "CD8alpha- CD11b+ dendritic cells present exogenous virus-like particles to CD8+ T cells and subsequently express CD8alpha and CD205 molecules," *J Exp Med*, vol. 195, no. 10, pp. 1233–1245, 2002.
- [25] T. Storni *et al.*, "Critical role for activation of antigen-presenting cells in priming of cytotoxic T cell responses after vaccination with virus-like particles," *J Immunol*, vol. 168, no. 6, pp. 2880–2886, 2002.
- [26] E. A. Herniou, J. A. Olszewski, J. S. Cory, and D. R. O'Reilly, "The genome sequence and evolution of baculoviruses," *Annu Rev Entomol*, vol. 48, pp. 211–234, 2003.
- [27] J. Slack and B. M. Arif, "The baculoviruses occlusion-derived virus: virion structure and function," *Adv Virus Res*, vol. 69, pp. 99–165, 2007.
- [28] G. W. Blissard, R. L. Quant-Russell, G. F. Rohrmann, and G. S. Beaudreau, "Nucleotide sequence, transcriptional mapping, and temporal expression of the gene encoding p39, a major structural protein of the multicapsid nuclear polyhedrosis virus of Orgyia pseudotsugata," *Virology*, vol. 168, no. 2, pp. 354–362, 1989.
- [29] L. A. Guarino and M. W. Smith, "Nucleotide sequence and characterization of the 39K gene region of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus," *Virology*, vol. 179, no. 1, pp. 1–8, 1990.
- [30] M. N. Pearson, R. L. Russell, G. F. Rohrmann, and G. S. Beaudreau, "p39, a major

- baculovirus structural protein: immunocytochemical characterization and genetic location,” *Virology*, vol. 167, no. 2, pp. 407–413, 1988.
- [31] S. M. Thiem and L. K. Miller, “Identification, sequence, and transcriptional mapping of the major capsid protein gene of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus,” *J Virol*, vol. 63, no. 5, pp. 2008–2018, 1989.
- [32] B. A. Federici, *The Biology of Baculoviruses. Ultrastructure of baculovirus*. 1986.
- [33] D. G. Boucias and Pendland, J. C., “Boucias, D. G., and Pendland, J. C.,” *Princ. Insect Pathol.*, pp. 111–146, 1998.
- [34] S. P. Kukkonen *et al.*, “Baculovirus capsid display: a novel tool for transduction imaging,” *Mol Ther*, vol. 8, no. 5, pp. 853–862, 2003.
- [35] M. J. Fraser, “Ultrastructural observations of virion maturation in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infected *Spodoptera frugiperda* cell cultures,” *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.*, vol. 95, no. 1–3, pp. 189–195, 1986.
- [36] O. Lung, M. Westenberg, J. M. Vlak, D. Zuidema, and G. W. Blissard, “Pseudotyping *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AcMNPV): F proteins from group II NPVs are functionally analogous to AcMNPV GP64,” *J Virol*, vol. 76, no. 11, pp. 5729–5736, 2002.
- [37] G. W. Blissard and J. R. Wenz, “Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion,” *J Virol*, vol. 66, no. 11, pp. 6829–6835, 1992.
- [38] K. L. Hefferon, A. G. Oomens, S. A. Monsma, C. M. Finnerty, and G. W. Blissard, “Host cell receptor binding by baculovirus GP64 and kinetics of virion entry,” *Virology*, vol. 258, no. 2, pp. 455–468, 1999.
- [39] A. G. Oomens and G. W. Blissard, “Requirement for GP64 to drive efficient budding of *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus,” *Virology*, vol. 254, no. 2, pp. 297–314, 1999.
- [40] A. M. Gronowski, D. M. Hilbert, K. C. Sheehan, G. Garotta, and R. D. Schreiber, “Baculovirus stimulates antiviral effects in mammalian cells,” *J Virol*, vol. 73, no. 12, pp. 9944–9951, 1999.

- [41] T. Abe, H. Takahashi, H. Hamazaki, N. Miyano-Kurosaki, Y. Matsuura, and H. Takaku, "Baculovirus induces an innate immune response and confers protection from lethal influenza virus infection in mice," *J Immunol*, vol. 171, no. 3, pp. 1133–1139, 2003.
- [42] T. Abe *et al.*, "Involvement of the Toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus," *J Virol*, vol. 79, no. 5, pp. 2847–2858, 2005.
- [43] S. Hervas-Stubbs, P. Rueda, L. Lopez, and C. Leclerc, "Insect baculoviruses strongly potentiate adaptive immune responses by inducing type I IFN," *J Immunol*, vol. 178, no. 4, pp. 2361–2369, 2007.
- [44] T. Abe *et al.*, "Involvement of the Toll-Like Receptor 9 Signaling Pathway in the Induction of Innate Immunity by Baculovirus Involvement of the Toll-Like Receptor 9 Signaling Pathway in the Induction of Innate Immunity by Baculovirus †," *J. Virol. Methods*, vol. 79, no. 5, pp. 2847–2858, 2005.
- [45] P. Molinari *et al.*, "Baculovirus treatment fully protects mice against a lethal challenge of FMDV," *Antivir. Res*, vol. 87, no. 2, pp. 276–279, 2010.
- [46] G. N. Molina, E. Tavarone, O. Taboga, and P. Molinari, "Two Distinctive Phenotypes of AcMNPV Display Different Immune Abilities and Intracellular Destiny," *PLoS One*, vol. 11, no. 12, p. e0168939, 2016.
- [47] J. House and C. Mebus, "Foot-and-mouth disease," in *Foreign Animal Diseases*, C. o. F. A. D. i. t. U. S. A. . Association, Ed. Richmond, VA, USA: Pat Campbell & Associates and Carter Printing Company, 1998, pp. 213–224.
- [48] M. J. Grubman and B. Baxt, "Foot-and-mouth disease," *Clin Microbiol Rev*, vol. 17, no. 2, pp. 465–493, 2004.
- [49] S. J. Barteling and J. Vreeswijk, "Developments in foot-and-mouth disease vaccines," *Vaccine*, vol. 9, no. 2, pp. 75–88, 1991.
- [50] K. C. McCullough, F. De Simone, E. Brocchi, L. Capucci, J. R. Crowther, and U. Kihm, "Protective immune response against foot-and-mouth disease," *J Virol*, vol. 66, no. 4, pp. 1835–1840, 1992.
- [51] J. D. Kitson, D. McCahon, and G. J. Belsham, "Sequence analysis of monoclonal

- antibody resistant mutants of type O foot and mouth disease virus: evidence for the involvement of the three surface exposed capsid proteins in four antigenic sites," *Virology*, vol. 179, no. 1, pp. 26–34, 1990.
- [52] M. G. Mateu, "Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view," *Virus Res*, vol. 38, no. 1, pp. 1–24, 1995.
- [53] M. G. Mateu, J. A. Camarero, E. Giralt, D. Andreu, and E. Domingo, "Direct evaluation of the immunodominance of a major antigenic site of foot-and-mouth disease virus in a natural host," *Virology*, vol. 206, no. 1, pp. 298–306, 1995.
- [54] J. R. Crowther, S. Farias, W. C. Carpenter, and A. R. Samuel, "Identification of a fifth neutralizable site on type O foot-and-mouth disease virus following characterization of single and quintuple monoclonal antibody escape mutants," *J Gen Virol*, vol. 74 (Pt 8), pp. 1547–1553, 1993.
- [55] P. W. Mason, E. Rieder, and B. Baxt, "RGD sequence of foot-and-mouth disease virus is essential for infecting cells via the natural receptor but can be bypassed by an antibody-dependent enhancement pathway," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 91, no. 5, pp. 1932–1936, 1994.
- [56] T. Jackson *et al.*, "Arginine-glycine-aspartic acid-specific binding by foot-and-mouth disease viruses to the purified integrin $\alpha(v)\beta_3$ in vitro," *J Virol*, vol. 71, no. 11, pp. 8357–8361, 1997.
- [57] D. Sa-Carvalho, E. Rieder, B. Baxt, R. Rodarte, A. Tanuri, and P. W. Mason, "Tissue culture adaptation of foot-and-mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle," *J Virol*, vol. 71, no. 7, pp. 5115–5123, 1997.
- [58] T. Collen, R. Dimarchi, and T. R. Doel, "A T cell epitope in VP1 of foot-and-mouth disease virus is immunodominant for vaccinated cattle," *J Immunol*, vol. 146, no. 2, pp. 749–755, 1991.
- [59] F. Brown, "New approaches to vaccination against foot-and-mouth disease," *Vaccine*, vol. 10, no. 14, pp. 1022–1026, 1992.
- [60] T. Collen, "Foot-and-mouth disease virus (aphthovirus): viral T cell epitopes.," *In Cell-Mediated Immunity in Ruminants*. p. 173–197., 1994.
- [61] F. Sobrino, E. Blanco, M. Garcia-Briones, and V. Ley, "Synthetic peptide vaccines:

- foot-and-mouth disease virus as a model,” *Dev Biol Stand*, vol. 101, pp. 39–43, 1999.
- [62] S. Uddowla, J. Hollister, J. M. Pacheco, L. L. Rodriguez, and E. Rieder, “A Safe Foot-and-Mouth Disease Vaccine Platform with Two Negative Markers for Differentiating Infected from Vaccinated Animals,” *J. Virol.*, vol. 86, no. 21, pp. 11675–11685, 2012.
- [63] O. Taboga *et al.*, “A large-scale evaluation of peptide vaccines against foot-and-mouth disease: lack of solid protection in cattle and isolation of escape mutants,” *J Virol*, vol. 71, no. 4, pp. 2606–2614, 1997.
- [64] C. Y. Wang *et al.*, “Effective synthetic peptide vaccine for foot-and-mouth disease in swine,” *Vaccine*, vol. 20, no. 19–20, pp. 2603–2610, 2002.
- [65] M. A. Whitt and J. S. Manning, “A phosphorylated 34-kDa protein and a subpopulation of polyhedrin are thiol linked to the carbohydrate layer surrounding a baculovirus occlusion body,” *Virology*, vol. 163, no. 1, pp. 33–42, 1988.
- [66] R. Hopkins, D. Esposito, and W. Gillette, “Widening the bottleneck: Increasing success in protein expression and purification,” *J. Struct. Biol.*, vol. 172, no. 1, pp. 14–20, 2010.
- [67] L. J. Reed and H. Muench, “A simple method of estimating fifty per cent endpoints,” *Am. J. Epidemiol.*, vol. 27, no. 3, pp. 493–497, 1938.
- [68] S. Y. Lin, Y. C. Chung, and Y. C. Hu, “Update on baculovirus as an expression and/or delivery vehicle for vaccine antigens,” *Expert Rev Vaccines*, vol. 13, no. 12, pp. 1501–1521, 2014.
- [69] S. T. Tjia, G. M. zu Altschiltsche, and W. Doerfler, “Autographa californica nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) DNA does not persist in mass cultures of mammalian cells,” *Virology*, vol. 125, no. 1, pp. 107–117, 1983.
- [70] W. Lin *et al.*, “In Vitro Survey of Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus Interaction with Nontarget Vertebrate Host Cells,” *Appl Env. Microbiol*, vol. 45, no. 3, pp. 1085–1093, 1983.
- [71] C. Y. Chen, C. Y. Lin, G. Y. Chen, and Y. C. Hu, “Baculovirus as a gene delivery vector: recent understandings of molecular alterations in transduced cells and latest applications,” *Biotechnol Adv*, vol. 29, no. 6, pp. 618–631, 2011.

-
- [72] J. P. Laakkonen *et al.*, "Clathrin-independent entry of baculovirus triggers uptake of *E. coli* in non-phagocytic human cells," *PLoS One*, vol. 4, no. 4, 2009.
- [73] S. Dong *et al.*, "Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus efficiently infects Sf9 cells and transduces mammalian cells via direct fusion with the plasma membrane at low pH," *J. Virol.*, vol. 84, no. 10, pp. 5351–9, 2010.
- [74] A. Paul and S. Prakash, "Baculovirus reveals a new pH-dependent direct cell-fusion pathway for cell entry and transgene delivery," *Future Virol.*, vol. 5, no. 5, pp. 533–537, 2010.
- [75] A. J. Mähönen *et al.*, "Culture medium induced vimentin reorganization associates with enhanced baculovirus-mediated gene delivery," *J. Biotechnol.*, vol. 145, no. 2, pp. 111–119, 2010.
- [76] T. Abe and Y. Matsuura, "Host innate immune responses induced by baculovirus in mammals," *Curr Gene Ther.*, vol. 10, no. 3, pp. 226–231, 2010.
- [77] T. Abe *et al.*, "Baculovirus induces type I interferon production through toll-like receptor-dependent and -independent pathways in a cell-type-specific manner," *J Virol*, vol. 83, no. 15, pp. 7629–7640, 2009.
- [78] C. K. Chuang *et al.*, "Baculovirus transduction of mesenchymal stem cells: in vitro responses and in vivo immune responses after cell transplantation," *Mol Ther*, vol. 17, no. 5, pp. 889–896, 2009.
- [79] G.-Y. Chen *et al.*, "Baculovirus transduction of mesenchymal stem cells triggers the toll-like receptor 3 pathway," *J. Virol.*, vol. 83, no. 20, pp. 10548–56, 2009.
- [80] C. Ono *et al.*, "Innate immune response induced by baculovirus attenuates transgene expression in mammalian cells," *J Virol*, vol. 88, no. 4, pp. 2157–2167, 2014.
- [81] S. Madhan, M. Prabakaran, and J. Kwang, "Baculovirus as Vaccine Vectors," *Curr. Gene Ther.*, vol. 10, pp. 201–213, 2010.
- [82] H. Tani, T. Abe, T. M. Matsunaga, and K. Moriishi, "Baculovirus vector for gene delivery and vaccine development," *Future Virol.*, vol. 3, pp. 35–43, 2008.
- [83] M. Klausberger *et al.*, "One-shot vaccination with an insect cell-derived low-dose influenza A H7 virus-like particle preparation protects mice against H7N9

- challenge,” *Vaccine*, vol. 32, no. 3, pp. 355–362, 2014.
- [84] I. Margine, L. Martinez-Gil, Y. ying Chou, and F. Krammer, “Residual Baculovirus in Insect Cell-Derived Influenza Virus-Like Particle Preparations Enhances Immunogenicity,” *PLoS One*, vol. 7, no. 12, 2012.
- [85] A. G. Lynch, F. Tanzer, M. J. Fraser, E. G. Shephard, A. L. Williamson, and E. P. Rybicki, “Use of the piggyBac transposon to create HIV-1 gag transgenic insect cell lines for continuous VLP production,” *BMC Biotechnol*, vol. 10, p. 30, 2010.
- [86] V. Quattrocchi, P. Molinari, C. Langellotti, V. Gnazzo, O. Taboga, and P. Zamorano, “Co-inoculation of baculovirus and FMDV vaccine in mice, elicits very early protection against foot and mouth disease virus without interfering with long lasting immunity,” *Vaccine*, vol. 31, no. 24, pp. 2713–2718, 2013.
- [87] N. Van Loo, E. Fortunati, E. Ehler, F. Grosveld, and B. J. Scholte, “Baculovirus Infection of Nondividing Mammalian Cells: Mechanisms of Entry and Nuclear Transport of Capsids Baculovirus Infection of Nondividing Mammalian Cells: Mechanisms of Entry and Nuclear Transport of Capsids,” vol. 75, no. 2, pp. 961–970, 2001.
- [88] H. Matilainen, J. Rinne, L. Gilbert, V. Marjomaki, H. Reunanen, and C. Oker-Blom, “Baculovirus entry into human hepatoma cells,” *J Virol*, vol. 79, no. 24, pp. 15452–15459, 2005.
- [89] M. Kitajima, H. Hamazaki, N. Miyano-Kurosaki, and H. Takaku, “Characterization of baculovirus Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus infection in mammalian cells,” *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 343, no. 2, pp. 378–384, 2006.
- [90] H. J. Lee *et al.*, “Immunogenicity of Bivalent Human Papillomavirus DNA Vaccine Using Human Endogenous Retrovirus Envelope-Coated Baculoviral Vectors in Mice and Pigs,” *PLoS One*, vol. 7, no. 11, pp. 1–10, 2012.
- [91] H. Cho *et al.*, “Immunogenicity of a trivalent human papillomavirus L1 DNA-encapsidated, non-replicable baculovirus nanovaccine,” *PLoS One*, vol. 9, no. 4, pp. 1–11, 2014.
- [92] A. Peralta, P. Molinari, D. Conte-Grand, G. Calamante, and O. Taboga, “A chimeric baculovirus displaying bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein D on its

- surface and their immunological properties,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 75, no. 2, pp. 407–414, 2007.
- [93] S. D. J. Chapple and I. M. Jones, “Non-polar distribution of green fluorescent protein on the surface of Autographa californica nucleopolyhedrovirus using a heterologous membrane anchor,” *J Biotechnol*, vol. 95, no. 3, pp. 269–275, 2002.
- [94] I. Shoji *et al.*, “Efficient gene transfer into various mammalian cells, including non-hepatic cells, by baculovirus vectors,” *J Gen Virol*, vol. 78 (Pt 10, pp. 2657–2664, 1997.
- [95] Q. Wu *et al.*, “A pseudotype baculovirus-mediated vaccine confers protective immunity against lethal challenge with H5N1 avian influenza virus in mice and chickens,” *Mol Immunol*, vol. 46, no. 11–12, pp. 2210–2217, 2009.
- [96] H. Huang *et al.*, “Construction and immunogenicity of a recombinant pseudotype baculovirus expressing the glycoprotein of rabies virus in mice,” *Arch. Virol.*, vol. 156, no. 5, pp. 753–758, 2011.
- [97] S. Yoshida, H. Araki, and T. Yokomine, “Baculovirus-based nasal drop vaccine confers complete protection against malaria by natural boosting of vaccine-induced antibodies in mice,” *Infect Immun*, vol. 78, no. 2, pp. 595–602, 2010.
- [98] A. M. Blagborough, S. Yoshida, J. Sattabongkot, T. Tsuboi, and R. E. Sinden, “Intranasal and intramuscular immunization with Baculovirus Dual Expression System-based Pvs25 vaccine substantially blocks Plasmodium vivax transmission,” *Vaccine*, vol. 28, no. 37, pp. 6014–6020, 2010.
- [99] S. Yoshida, M. Kawasaki, N. Hariguchi, K. Hirota, and M. Matsumoto, “A baculovirus dual expression system-based malaria vaccine induces strong protection against Plasmodium berghei sporozoite challenge in mice,” *Infect Immun*, vol. 77, no. 5, pp. 1782–1789, 2009.
- [100] W. Lin *et al.*, “A baculovirus dual expression system-based vaccine confers complete protection against lethal challenge with H9N2 avian influenza virus in mice,” *Virol. J.*, vol. 8, p. 273, 2011.
- [101] Y. Ye *et al.*, “Induction of robust immunity response in mice by dual-expression-system-based recombinant baculovirus expressing the capsid protein of porcine

- circovirus type 2,” *Virology*, vol. 10, p. 316, 2013.
- [102] J. Zhang, X. W. Chen, T. Z. Tong, Y. Ye, M. Liao, and H. Y. Fan, “BacMam virus-based surface display of the infectious bronchitis virus (IBV) S1 glycoprotein confers strong protection against virulent IBV challenge in chickens,” *Vaccine*, vol. 32, no. 6, pp. 664–670, 2014.
- [103] M. Iyori *et al.*, “Protective efficacy of baculovirus dual expression system vaccine expressing *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein,” *PLoS One*, vol. 8, no. 8, p. e70819, 2013.
- [104] P. Molinari, M. I. Crespo, M. J. Gravisaco, O. Taboga, G. Moron, and G. Morón, “Baculovirus capsid display potentiates OVA cytotoxic and innate immune responses,” *PLoS One*, vol. 6, no. 8, p. e24108, 2011.
- [105] C. Oker-Blom, K. J. Airene, and R. Grabherr, “Baculovirus display strategies: Emerging tools for eukaryotic libraries and gene delivery,” *Br. Funct Genomic Proteomic*, vol. 2, no. 3, pp. 244–253, 2003.
- [106] M. Ikawa, K. Kominami, Y. Yoshimura, K. Tanaka, Y. Nishimune, and M. Okabe, “A rapid and non-invasive selection of transgenic embryos before implantation using green fluorescent protein (GFP),” *FEBS Lett*, vol. 375, no. 1–2, pp. 125–128, 1995.
- [107] S. C. Eisenbarth, O. R. Colegio, W. O’Connor, F. S. Sutterwala, and R. A. Flavell, “Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants,” *Nature*, vol. 453, no. 7198, pp. 1122–1126, 2008.
- [108] F. Thiele *et al.*, “Modified vaccinia virus Ankara-infected dendritic cells present CD4⁺ T-cell epitopes by endogenous major histocompatibility complex class II presentation pathways,” *J Virol*, vol. 89, no. 5, pp. 2698–2709, 2015.
- [109] V. Quattrocchi, J. S. Pappalardo, C. Langellotti, E. Smitsaart, N. Fondevila, and P. Zamorano, “Early protection against foot-and-mouth disease virus in cattle using an inactivated vaccine formulated with Montanide ESSAI IMS D 12802 VG PR adjuvant,” *Vaccine*, vol. 32, no. 19, pp. 2167–2172, 2014.
- [110] A. J. Forman and E. P. Gibbs, “Studies with foot-and-mouth disease virus in British deer (red, fallow and roe),” *J Comp Pathol*, vol. 84, no. 2, pp. 215–220, 1974.
- [111] L. Prescott, J. Harley, and D. Klein, *Microbiología*. McGraw-Hill, 1999.

-
- [112] A. R. Carroll, D. J. Rowlands, and B. E. Clarke, "The complete nucleotide sequence of the RNA coding for the primary translation product of foot and mouth disease virus," *Nucleic Acids Res*, vol. 12, no. 5, pp. 2461–2472, 1984.
- [113] C. Vasquez, C. D. Denoya, J. L. La Torre, and E. L. Palma, "Structure of foot-and-mouth disease virus capsid," *Virology*, vol. 97, no. 1, pp. 195–200, 1979.
- [114] P. Talbot, D. J. Rowlands, J. N. Burroughs, D. V Sangar, and F. Brown, "Evidence for a group protein in foot-and-mouth disease virus particles," *J Gen Virol*, vol. 19, no. 3, pp. 369–380, 1973.
- [115] S. Forss, K. Strebel, E. Beck, and H. Schaller, "Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus," *Nucleic Acids Res*, vol. 12, no. 16, pp. 6587–6601, 1984.
- [116] J. F. Newman *et al.*, "Foot-and-mouth disease virus particles contain replicase protein 3D," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 91, no. 2, pp. 733–737, 1994.
- [117] S. M. Jamal and G. J. Belsham, "Foot-and-mouth disease: past, present and future," *Vet Res*, vol. 44, no. 1, pp. 1–14, 2013.
- [118] J. Flint, L. Enquist, R. Krug, V. Racaniello, and M. Skalka, *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control*. ASM Press, 2009.
- [119] E. Martinez-Salas, S. Lopez de Quinto, R. Ramos, and O. Fernandez-Miragall, "IRES elements: features of the RNA structure contributing to their activity," *Biochimie*, vol. 84, no. 8, pp. 755–763, 2002.
- [120] M. J. Grubman, "The 5' end of foot-and-mouth disease virion RNA contains a protein covalently linked to the nucleotide pUp," *Arch Virol*, vol. 63, no. 3–4, pp. 311–315, 1980.
- [121] D. V Sangar, D. J. Rowlands, T. J. Harris, and F. Brown, "Protein covalently linked to foot-and-mouth disease virus RNA," *Nature*, vol. 268, no. 5621, pp. 648–650, 1977.
- [122] M. J. Grubman, B. H. Robertson, D. O. Morgan, D. M. Moore, and D. Dowbenko, "Biochemical map of polypeptides specified by foot-and-mouth disease virus," *J Virol*, vol. 50, no. 2, pp. 579–586, 1984.

-
- [123] B. H. Robertson *et al.*, "Nucleotide and amino acid sequence coding for polypeptides of foot-and-mouth disease virus type A12," *J Virol*, vol. 54, no. 3, pp. 651–660, 1985.
- [124] E. Batschelet, E. Domingo, and C. Weissmann, "The proportion of revertant and mutant phage in a growing population, as a function of mutation and growth rate," *Gene*, vol. 1, no. 1, pp. 27–32, 1976.
- [125] J. W. Drake, "Rates of spontaneous mutation among RNA viruses," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 90, no. 9, pp. 4171–4175, 1993.
- [126] J. W. Drake and J. J. Holland, "Mutation rates among RNA viruses," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 96, no. 24, pp. 13910–13913, 1999.
- [127] R. G. Webster, W. G. Laver, G. M. Air, and G. C. Schild, "Molecular mechanisms of variation in influenza viruses," *Nature*, vol. 296, no. 5853, pp. 115–121, 1982.
- [128] E. Friedberg, G. Walker, W. Siede, R. Wood, and R. Shultz, *DNA Repair and Mutagenesis*, 2nd ed. ASM Press, 2006.
- [129] E. Domingo, M. Davila, and J. Ortin, "Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from a natural population of foot-and-mouth-disease virus," *Gene*, vol. 11, no. 3–4, pp. 333–346, 1980.
- [130] C. K. Biebricher and M. Eigen, "What is a quasispecies?," *Curr Top Microbiol Immunol*, vol. 299, pp. 1–31, 2006.
- [131] E. Domingo and J. J. Holland, "RNA virus mutations and fitness for survival," *Annu Rev Microbiol*, vol. 51, pp. 151–178, 1997.
- [132] C. Escarmis, E. Lazaro, A. Arias, and E. Domingo, "Repeated bottleneck transfers can lead to non-cytocidal forms of a cytopathic virus: implications for viral extinction," *J Mol Biol*, vol. 376, no. 2, pp. 367–379, 2008.
- [133] M. L. Donnelly, D. Gani, M. Flint, S. Monaghan, and M. D. Ryan, "The cleavage activities of aphthovirus and cardiovirus 2A proteins," *J Gen Virol*, vol. 78 (Pt 1), pp. 13–21, 1997.
- [134] E. Fry, D. I. Stuart, and D. J. Rowlands, "The Structure of Foot-and-Mouth Disease Virus," in *Foot-and-Mouth Disease Virus*, B. Mahy, Ed. Atlanta, USA: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005, pp. 71–102.

- [135] M. Chow, J. F. Newman, D. Filman, J. M. Hogle, D. J. Rowlands, and F. Brown, "Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance," *Nature*, vol. 327, no. 6122, pp. 482–486, 1987.
- [136] P. W. Mason, M. J. Grubman, and B. Baxt, "Molecular basis of pathogenesis of FMDV," *Virus Res*, vol. 91, no. 1, pp. 9–32, 2003.
- [137] R. Acharya, E. Fry, D. Stuart, G. Fox, D. Rowlands, and F. Brown, "The structure of foot-and-mouth disease virus: implications for its physical and biological properties," *Vet Microbiol*, vol. 23, no. 1–4, pp. 21–34, 1990.
- [138] R. Acharya, E. Fry, D. Stuart, G. Fox, D. Rowlands, and F. Brown, "The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution," *Nature*, vol. 337, no. 6209, pp. 709–716, 1989.
- [139] T. Jackson, A. M. King, D. I. Stuart, and E. Fry, "Structure and receptor binding," *Virus Res*, vol. 91, no. 1, pp. 33–46, 2003.
- [140] G. A. König, E. L. Palma, E. Maradei, and M. E. Piccone, "Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus types A and O isolated in Argentina during the 2000–2002 epizootic," *Vet Microbiol*, vol. 124, no. 1–2, pp. 1–15, 2007.
- [141] E. Rieder, A. Berinstein, B. Baxt, A. Kang, and P. W. Mason, "Propagation of an attenuated virus by design: engineering a novel receptor for a noninfectious foot-and-mouth disease virus," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 93, no. 19, pp. 10428–10433, 1996.
- [142] B. Baxt and E. Rieder, "Molecular Aspects of Foot-and-Mouth Disease Virus Virulence and Host Range: Role of Host Cell Receptors and Viral Factors," in *Foot and Mouth Disease: Current Perspectives*, F. Sobrino and E. Domingo, Eds. Norfolk, Inglaterra: Horizon Bioscience, 2004, pp. 145–172.
- [143] E. Rieder, T. Henry, H. Duque, and B. Baxt, "Analysis of a foot-and-mouth disease virus type A24 isolate containing an SGD receptor recognition site in vitro and its pathogenesis in cattle," *J Virol*, vol. 79, no. 20, pp. 12989–12998, 2005.
- [144] S. Curry *et al.*, "Dissecting the roles of VP0 cleavage and RNA packaging in picornavirus capsid stabilization: the structure of empty capsids of foot-and-mouth disease virus," *J Virol*, vol. 71, no. 12, pp. 9743–9752, 1997.

- [145] D. Logan *et al.*, "Structure of a major immunogenic site on foot-and-mouth disease virus," *Nature*, vol. 362, no. 6420, pp. 566–568, 1993.
- [146] C. Carrillo *et al.*, "Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus," *J Virol*, vol. 79, no. 10, pp. 6487–6504, 2005.
- [147] R. R. Rueckert, V. Racaniello, R. R. Rueckert, and V. Racaniello, "Picornaviridae: the viruses and their replication," in *Fields Virology*, 4th ed., D. Knipe, P. Howley, D. Griffin, R. Lamb, M. Martin, B. Roizman, and S. Straus, Eds. Philadelphia, PA, USA: Lippincott-Raven, 2001, pp. 609–654.
- [148] Y. Gao, S.-Q. Sun, and H.-C. Guo, "Biological function of Foot-and-mouth disease virus non-structural proteins and non-coding elements," *Viol. J.*, vol. 13, no. 1, p. 107, 2016.
- [149] T. R. Doel, "Natural and vaccine induced immunity to FMD," *Curr Top Microbiol Immunol*, vol. 288, pp. 103–131, 2005.
- [150] M. A. Martinez *et al.*, "Genetic and immunogenic variations among closely related isolates of foot-and-mouth disease virus," *Gene*, vol. 62, no. 1, pp. 75–84, 1988.
- [151] T. R. Doel, "FMD vaccines," *Virus Res*, vol. 91, no. 1, pp. 81–99, 2003.
- [152] P. V Barnett and H. Carabin, "A review of emergency foot-and-mouth disease (FMD) vaccines," *Vaccine*, vol. 20, no. 11–12, pp. 1505–1514, 2002.
- [153] A. J. Childerstone, L. Cedillo-Baron, M. Foster-Cuevas, and R. M. Parkhouse, "Demonstration of bovine CD8+ T-cell responses to foot-and-mouth disease virus," *J Gen Virol*, vol. 80 (Pt 3), pp. 663–669, 1999.
- [154] T. Collen and T. R. Doel, "Heterotypic recognition of foot-and-mouth disease virus by cattle lymphocytes," *J Gen Virol*, vol. 71 (Pt 2), pp. 309–315, 1990.
- [155] J. C. Saiz, A. Rodriguez, M. Gonzalez, F. Alonso, and F. Sobrino, "Heterotypic lymphoproliferative response in pigs vaccinated with foot-and-mouth disease virus. Involvement of isolated capsid proteins," *J Gen Virol*, vol. 73 (Pt 10), pp. 2601–2607, 1992.
- [156] T. Collen, L. Pullen, and T. R. Doel, "T cell-dependent induction of antibody against foot-and-mouth disease virus in a mouse model," *J Gen Virol*, vol. 70 (Pt 2),

- no. 2, pp. 395–403, 1989.
- [157] E. M. Bautista, G. S. Ferman, and W. T. Golde, “Induction of lymphopenia and inhibition of T cell function during acute infection of swine with foot and mouth disease virus (FMDV),” *Vet Immunol Immunopathol*, vol. 92, no. 1–2, pp. 61–73, 2003.
- [158] F. Diaz-San Segundo, F. J. Salguero, A. de Avila, M. M. de Marco, M. A. Sanchez-Martin, and N. Sevilla, “Selective lymphocyte depletion during the early stage of the immune response to foot-and-mouth disease virus infection in swine,” *J Virol*, vol. 80, no. 5, pp. 2369–2379, 2006.
- [159] S. Garcia-Nunez *et al.*, “Differences in the virulence of two strains of Foot-and-Mouth Disease Virus Serotype A with the same spatiotemporal distribution,” *Virus Res*, vol. 147, no. 1, pp. 149–152, 2010.
- [160] F. J. Salguero *et al.*, “Foot-and-mouth disease virus (FMDV) causes an acute disease that can be lethal for adult laboratory mice,” *Virology*, vol. 332, no. 1, pp. 384–396, 2005.
- [161] M. Cacciabue *et al.*, “Differential replication of Foot-and-mouth disease viruses in mice determine lethality,” *Virology*, vol. 509, pp. 195–204, 2017.
- [162] A. V. Capozzo *et al.*, “Vesicular Stomatitis Virus glycoprotein G carrying a tandem dimer of Foot and Mouth Disease Virus antigenic site A can be used as DNA and peptide vaccine for cattle,” *Antiviral Res.*, vol. 92, no. 2, pp. 219–227, 2011.
- [163] J. M. Juran and A. B. Godfrey, *Juran’s Quality Control Handbook*. 1998.
- [164] A. S. Rathore, “Roadmap for implementation of quality by design (QbD) for biotechnology products,” *Trends Biotechnol.*, vol. 27, no. 9, pp. 546–553, 2009.
- [165] K. S. Rosenthal and D. H. Zimmerman, “Vaccines: all things considered,” *Clin Vaccine Immunol*, vol. 13, no. 8, pp. 821–829, 2006.
- [166] A. Lanzavecchia and F. Sallusto, “Regulation of T cell immunity by dendritic cells,” *Cell*, vol. 106, no. 3, pp. 263–266, 2001.
- [167] B. Pulendran and R. Ahmed, “Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development,” *Cell*, vol. 124, no. 4, pp. 849–863,

2006.

- [168] E. Hoffmann, F. Kotsias, G. Visentin, P. Bruhns, A. Savina, and S. Amigorena, "Autonomous phagosomal degradation and antigen presentation in dendritic cells," vol. 109, no. 36, 2012.
- [169] M. I. Yuseff, P. Pierobon, A. Reversat, and A. M. Lennon-Dumenil, "How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity," *Nat Rev Immunol*, vol. 13, no. 7, pp. 475–486, 2013.
- [170] Y. Cao *et al.*, "A pseudotype baculovirus expressing the capsid protein of foot-and-mouth disease virus and a T-cell immunogen shows enhanced immunogenicity in mice," *Virol J*, vol. 8, no. 1, p. 77, 2011.
- [171] R. Fang *et al.*, "Construction and immunogenicity of pseudotype baculovirus expressing *Toxoplasma gondii* SAG1 protein in BALB/c mice model," *Vaccine*, vol. 28, no. 7, pp. 1803–1807, 2010.
- [172] G. Mlambo, N. Kumar, and S. Yoshida, "Functional immunogenicity of baculovirus expressing Pfs25, a human malaria transmission-blocking vaccine candidate antigen," *Vaccine*, vol. 28, no. 43, pp. 7025–7029, 2010.
- [173] X. G. Xu *et al.*, "Baculovirus surface display of E envelope glycoprotein of Japanese encephalitis virus and its immunogenicity of the displayed proteins in mouse and swine models," *Vaccine*, vol. 29, no. 4, pp. 636–643, 2011.
- [174] W. W. Rodrigo *et al.*, "Dengue virus neutralization is modulated by IgG antibody subclass and Fcγ receptor subtype," *Virology*, vol. 394, no. 2, pp. 175–182, 2009.
- [175] L. Lin, A. J. Gerth, and S. L. Peng, "CpG DNA redirects class-switching towards 'Th1-like' Ig isotype production via TLR9 and MyD88," *Eur. J. Immunol.*, vol. 34, no. 5, pp. 1483–1487, 2004.
- [176] M. Salminen *et al.*, "Improvement in nuclear entry and transgene expression of baculoviruses by disintegration of microtubules in human hepatocytes," *J Virol*, vol. 79, no. 5, pp. 2720–2728, 2005.
- [177] N. D. van Loo, E. Fortunati, E. Ehlert, M. Rabelink, F. Grosveld, and B. J. Scholte, "Baculovirus infection of nondividing mammalian cells: mechanisms of entry and

- nuclear transport of capsids,” *J Virol*, vol. 75, no. 2, pp. 961–970, 2001.
- [178] G. Moron, G. Dadaglio, and C. Leclerc, “New tools for antigen delivery to the MHC class I pathway,” *Trends Immunol*, vol. 25, no. 2, pp. 92–97, 2004.
- [179] V. Quattrocchi *et al.*, “Role of macrophages in early protective immune responses induced by two vaccines against foot and mouth disease,” *Antiviral Res.*, vol. 92, no. 2, pp. 262–270, 2011.
- [180] A. Peralta, G. A. Maroniche, V. Alfonso, P. Molinari, and O. Taboga, “VP1 protein of Foot-and-mouth disease virus (FMDV) impairs baculovirus surface display,” *Virus Res.*, vol. 175, no. 1, pp. 87–90, 2013.
- [181] C. Cubillos *et al.*, “Enhanced Mucosal Immunoglobulin A Response and Solid Protection against Foot-and-Mouth Disease Virus Challenge Induced by a Novel Dendrimeric Peptide,” *J. Virol.*, vol. 82, no. 14, pp. 7223–7230, 2008.
- [182] I. Soria *et al.*, “Dendrimeric peptides can confer protection against foot-and-mouth disease virus in cattle,” *PLoS One*, vol. 12, no. 9, pp. 1–16, 2017.
- [183] W. Ernst, T. Schinko, A. Spenger, C. Oker-Blom, and R. Grabherr, “Improving baculovirus transduction of mammalian cells by surface display of a RGD-motif,” *J Biotechnol*, vol. 126, no. 2, pp. 237–240, 2006.
- [184] J. M. Karo, D. G. Schatz, and J. C. Sun, “The RAG recombinase dictates functional heterogeneity and cellular fitness in natural killer cells,” *Cell*, vol. 159, no. 1, pp. 94–107, 2014.
- [185] M. T. Orr and L. L. Lanier, “Natural Killer Cell Education and Tolerance,” *Cell*, vol. 142, no. 6, pp. 847–856, 2010.
- [186] H. Arase, E. S. Mocarski, A. E. Campbell, A. B. Hill, and L. L. Lanier, “Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors,” *Science (80-.)*, vol. 296, no. 5571, pp. 1323–1326, 2002.
- [187] M. G. Brown, “Vital Involvement of a Natural Killer Cell Activation Receptor in Resistance to Viral Infection,” *Science (80-.)*, vol. 292, no. 5518, pp. 934–937, 2001.
- [188] K. A. Daniels, G. Devora, W. C. Lai, C. L. O'Donnell, M. Bennett, and R. M. Welsh, “Murine cytomegalovirus is regulated by a discrete subset of natural killer

- cells reactive with monoclonal antibody to Ly49H.," *J. Exp. Med.*, vol. 194, no. 1, pp. 29–44, 2001.
- [189] J. C. Sun, J. N. Beilke, L. L. Lanier, and S. Francisco, "Adaptive Immune Features of Natural Killer Cells Joseph," *Nature*, vol. 457, no. 7229, pp. 557–561, 2009.
- [190] J. C. Sun, S. Lopez-Verges, C. C. Kim, J. L. DeRisi, and L. L. Lanier, "NK Cells and Immune 'Memory,'" *J. Immunol.*, vol. 186, no. 4, pp. 1891–1897, 2011.
- [191] M. F. Abdul-Careem *et al.*, "Genital HSV-2 infection induces short-term NK cell memory," *PLoS One*, vol. 7, no. 3, 2012.
- [192] G. O. Gillard *et al.*, "Thy1 + nk cells from vaccinia virus-primed mice confer protection against vaccinia virus challenge in the absence of adaptive lymphocytes," *PLoS Pathog.*, vol. 7, no. 8, 2011.
- [193] P. Bostik *et al.*, "Decreased NK Cell Frequency and Function Is Associated with Increased Risk of KIR3DL Allele Polymorphism in Simian Immunodeficiency Virus-Infected Rhesus Macaques with High Viral Loads," *J. Immunol.*, vol. 182, no. 6, pp. 3638–3649, 2009.
- [194] Y. Takahashi *et al.*, "In Vivo Administration of a JAK3 Inhibitor during Acute SIV Infection Leads to Significant Increases in Viral Load during Chronic Infection," *PLoS Pathog.*, vol. 10, no. 3, 2014.
- [195] M. M. Berrien-Elliott, J. A. Wagner, and T. A. Fehniger, "Human Cytokine-Induced Memory-Like Natural Killer Cells," *J. Innate Immun.*, vol. 7, no. 6, pp. 563–571, 2015.
- [196] M. P. Keppel, L. Yang, and M. A. Cooper, "Murine NK Cell Intrinsic Cytokine-Induced Memory-like Responses Are Maintained following Homeostatic Proliferation," *J. Immunol.*, vol. 190, no. 9, pp. 4754–4762, 2013.
- [197] M. J. G. van Helden, D. M. W. Zaiss, and A. J. A. M. Sijts, "CCR2 Defines a Distinct Population of NK Cells and Mediates Their Migration during Influenza Virus Infection in Mice," *PLoS One*, vol. 7, no. 12, 2012.

